

**Biochemische und funktionelle Charakterisierung der
Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der
Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem
Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von
Diplom-Biochemikerin Norma Baum
geboren am 09.04.1979 in Jena

1.Gutachter: Prof. Frank Grosse, Jena
2.Gutachter: PD Dr. Peter Hemmerich, Jena
3.Gutachter: Prof. Jochen Dahm-Daphi, Hamburg

Disputation: 29.03.2010 in Jena

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zelluläre Alterung, DNA-Schädigung und Zellzykluskontrolle	1
1.2	Der Tumorsuppressor p53	2
1.2.1	Funktionen des p53-Proteins	2
1.2.1.1	Eliminierung tumorigener Zellen durch p53	4
1.2.1.1.1	Einleitung der Apoptose	4
1.2.1.1.2	Seneszenz und Differenzierung	6
1.2.1.2	p53 und Signalwege zum Fortbestand der Zelle	7
1.2.1.2.1	Zellzyklusarrest	7
1.2.1.2.2	DNA-Reparatur	9
1.2.2	Regulation des p53-Proteins	10
1.2.2.1	Posttranslationale Modifikationen	10
1.2.2.2	Abbau des p53-Proteins	11
1.2.3	Die Prolin-reiche Domäne	13
1.2.4	Regulation der p53-Funktion durch Änderungen in der Proteinfaltung	15
1.3	Molekulare Chaperone – Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> Isomerasen	16
1.3.1	Cyclophiline	17
1.3.1.1	Cyclophilin 18 (Cyp 18, Cyclophilin A)	18
1.3.1.2	Der Cyclophilin 18-Inhibitor Cyclosporin A	20
1.4	Zielstellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Zellkultur	23
2.1.1.1	Zelllinien	23
2.1.1.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	23
2.1.2	Antikörper	24
2.1.2.1	Primäre Antikörper	24
2.1.2.2	Sekundäre Antikörper	24
2.1.3	Proteine/Peptide	25
2.1.4	Enzyme/Inhibitoren/Marker	25
2.1.5	Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	25
2.1.6	Geräte	27

2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.1.1 Generelle Zellkultur	28
2.2.1.2 Cyclosporin A-Behandlung der Zellen in Kultur	29
2.2.1.3 UVC-Bestrahlung der Zellen in Kultur	29
2.2.2 Immunfluoreszenz	29
2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)	30
2.2.4 Herstellung von zellulären Proteinextrakten	30
2.2.4.1 Herstellung von gesamtzellulären Proteinextrakten	30
2.2.4.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakten	31
2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	32
2.2.6 Immunaффinitäts-Chromatografie	33
2.2.7 Band-Shift-Analyse (EMSA)	33
2.2.8 Co-Immunopräzipitation	34
2.2.9 SDS-PAGE (1D)	34
2.2.10 Coomassie-Färbung von Proteingelen	35
2.2.11 Immunodetektion mittels Western-Blot	36
2.2.11.1 Semidry-Western-Blot	36
2.2.11.2 Fluoreszenzfärbung der Proteine	36
2.2.11.3 Immunologische Detektierung	36
2.2.12 Far-Western-Analyse	37
2.2.13 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)	38
2.2.13.1 Isoelektrische Fokussierung	39
2.2.13.2 SDS-PAGE (2D)	40
2.2.14 Protease-Verdau von Proteinbanden und Proteinspots	41
2.2.15 Massenspektrometrische Analyse (LC-ESI-MS)	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Proteomischer Ansatz zur Identifizierung von p53-Interaktionspartnern	43
3.1.1 Subzelluläre Lokalisierung des Tumorsuppressorproteins p53 in verschiedenen humanen Tumorzelllinien	43
3.1.2 MS-basierte Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen aus zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfraktionen	45
3.2 Analyse der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase Cyclophilin 18	49
3.2.1 Biochemische Charakterisierung der Proteine p53 und Cyp 18	49
3.2.1.1 Subzelluläre Lokalisierung von p53 und Cyp 18	49

3.2.1.2	Posttranslationale Modifikationen der Proteine p53 und Cyp 18	50
3.2.2	Charakterisierung der p53/Cyclophilin 18-Interaktion	54
3.2.2.1	<i>In vitro</i> Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion	54
3.2.2.2	Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion in lebenden Zellen	56
3.2.3	Der Einfluss der p53/Cyp 18-Interaktion auf die p53-Funktion	59
4	Diskussion	64
4.1	Die Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase Cyclophilin 18 interagiert im Zellkern und im Zytoplasma von primären und von Tumoren abgeleiteten Zellen mit p53	67
4.2	Die Interaktion des p53 mit Cyp 18 setzt eine aktive PPlase voraus	69
4.3	Die Bindestelle des Cyp 18 ist in der Prolin-reichen Region des p53-Proteins lokalisiert	69
4.4	Cyclophilin 18 inhibiert die Sequenz-spezifische DNA-Bindung des p53 <i>in vitro</i>	72
4.5	Cyclosporin A-Behandlung ändert die Zellzyklusverteilung p53-abhängig und beeinflusst die p53-Zielgen-Expression	73
4.6	Ausblick	74
5	Zusammenfassung	76
6	Abstract	77
7	Literaturverzeichnis	78
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	II
	Erklärung	III
	Lebenslauf	IV
	Danksagung	V

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Alterung, DNA-Schädigung und Zellzykluskontrolle

Der Prozess der Seneszenz umfasst die im Allgemeinen nicht reversiblen Abläufe, die zwangsläufig zum Absterben des Organismus führen. Das Verständnis der verschiedenen Mechanismen, welche die fortschreitende Verminderung der Funktionen von Zellen und Geweben verursachen, ist hilfreich in der Entwicklung von Therapien zur Verzögerung und Behandlung Alters-abhängiger Umstände und Krankheiten. Eine Vielzahl von Stress-Faktoren, wie beispielsweise mitogene Signale, DNA-Schäden und nicht-genotoxische Chromatin-Zerstörungen, verursachen zelluläre Seneszenz, ein Stadium permanenten Zellzyklusarrests. Die zelluläre Seneszenz, obwohl im jungen Organismus nützlich um Krebs zu verhindern, wird als Alters-fördernd angesehen. Symptome der vorzeitigen Alterung, die durch Defekte in der zellulären Antwort und Reparatur von DNA-Schädigung hervorgerufen werden, kennzeichnen die Auswirkungen akkumulierter Schäden. Die komplexe Biologie der Alterung wird sowohl durch umweltbedingte als auch durch genetische Faktoren beeinflusst. Stochastische DNA-Schäden verursachen einen Abfall der zellulären Funktion und die Genetik legt die Rate der Schadens-Akkumulation und der Abnahme der Funktion fest. Krebs ist überwiegend eine Krankheit der älteren Bevölkerung (Balducci, 2005). Als Grund wird die Akkumulation von Mutationen in individuellen Zellen im Laufe des Lebens angenommen.

Der eukaryotische Zellzyklus besteht aus einer zeitlich geordneten Folge von Prozessen. Diese Ordnung ist notwendig, um adäquate Zellwachstumsphasen (G1- und G2-Phase), jeweils vor der DNA-Synthese (S-Phase) und der Zellteilung oder Mitose (M-Phase), ablaufen zu lassen. In der S-Phase wird die DNA in zwei identische Kopien repliziert. Anschließend teilt sich in der Mitose-Phase die Zelle in zwei identische Tochterzellen. Endogene Quellen der DNA-Schädigung resultieren aus dem zellulären Metabolismus oder Routinefehlern in der DNA-Replikation und Rekombination. Zusätzlich führt die zelluläre Exposition exogener genotoxischer Agenzien, wie beispielsweise ultraviolette Strahlung (UV), oxidativer Stress und chemische Mutagene, zu einer Vielzahl von Nukleotid-Modifikationen und DNA-Strangbrüchen. Um diese Angriffe auf das Genom abzuwehren, hat die Zelle Systeme entwickelt, die einen Zellzyklusarrest initiieren, um die benötigte Zeit bereitzustellen, es einer spezialisierten Gruppe von Proteinen zu ermöglichen, den

aufgetretenen Schaden zu reparieren. Das System der DNA-Schadensantwort aktiviert den entsprechenden DNA-Reparatur-Signalweg oder induziert, im Fall irreparabler Schädigung, den programmierten Zelltod (Apoptose). Zellzyklus- und DNA-Schadens-Kontrollpunkte existieren, um den Ablauf des Zellzyklus in Gegenwart von endogenem und exogenem Stress zu gewährleisten. Viele Proteine, die an diesen Kontrollpunkten beteiligt sind, agieren, um die Genauigkeit des Zellzyklus abzusichern und fungieren als wichtige Barrieren dessen Fortschreitens unter Stresskonditionen bis zum Abschluss der Reparatur der DNA-Schäden. In Fällen irreparabler DNA-Schädigung kommt es zur Einleitung der Apoptose (Laiho, 2003 und Sancar, 2004).

1.2 Der Tumorsuppressor p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein durch Stress aktivierbarer sequenz-spezifischer nuklearer Transkriptionsfaktor. Dieser ist in der Lage Zellzyklusarrest einzuleiten und Apoptose oder Seneszenz zu induzieren. Das p53-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Minimierung genetischer Schäden und somit im Schutz der Zelle vor genomischer Instabilität. Die biochemische Aktivität des p53 als Transkriptionsfaktor wird durch verschiedene Partnerproteine reguliert, die dessen Stabilität, Kerntransport, posttranslationale Modifikationen und die Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie beeinflussen (Vogelstein, 2000).

1.2.1 Funktionen des p53-Proteins

Das Phosphoprotein p53, erstmals 1979 als Interaktionspartner des großen T-Antigens des DNA-Tumor-Virus SV-40 beschrieben (Lane, 1979), ist einer der am intensivsten erforschten Tumorsuppressoren. Humanes p53 besteht aus 393 Aminosäuren, die sich in strukturell und funktionell verschiedene Domänen trennen lassen: eine saure N-terminale Region, welche die 42 AS umfassende Transaktivierungsdomäne enthält, der eine Prolin-reiche Region folgt, eine zentrale Sequenz-spezifische DNA-Bindedomäne, eine Tetramerisierungsdomäne und eine basische C-terminal gelegene regulatorische Domäne (Abbildung 1.1) (Soussi, 1996).



Abbildung 1.1: Protein-Domänen des p53

Die Aminosäuren (AS) 1-42 bilden die Transaktivierungsdomäne (rot), AS 62-92 beinhalten ein Prolin-reiches Segment (gelb), AS 102-292 die zentrale, sequenz-spezifische DNA-Binderegion (türkis), AS 300-323 das primäre Kernlokalisierungssignal (hellblau), AS 324-356 die Tetramerisierungsdomäne (blau), die das Kernexportsignal enthält und AS 363-393 die negativ regulatorische Domäne (dunkelblau).

Das p53-Protein initiiert Zellzyklusarrest, um DNA-Reparaturprozesse zu ermöglichen oder leitet Apoptose ein, wenn die DNA-Schäden irreparabel sind. Zusätzlich ist p53 in der Lage, Apoptosewege unabhängig von seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor einzuleiten. Die Art der DNA-Schädigung ermöglicht p53 die selektive Auswahl verschiedener Promotoren zur Induktion der Zielgene. Dies befähigt p53 zur Regulation der Zielgenexpression und der daraus entstehenden zellulären Folgen.

Der Verlust der p53-Funktion resultiert in genomischer Instabilität und Tumorentstehung. Die Hypothese der Rolle des p53 in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität wird gestützt durch klinische Befunde, dass dieses Molekül in etwa 50% der Tumoren mutiert vorliegt und diese Tumorarten schlecht auf medizinische Behandlungen ansprechen (Lane, 1992; Vousden, 2000 und Harris, 2005). Weiterhin spielt p53 eine Rolle in der Regulation der Glykolyse, in der Autophagie, der Reparatur genotoxischer Schäden, Invasion und Motilität, der Angiogenese und der Differenzierung (Teodoro, 1997; Roger, 2006; Bensaad, 2007; Crighton, 2006 und Stiewe, 2007). Als Antwort auf genotoxische Stress-Signale oder DNA-Schädigung wird p53 posttranslational modifiziert, akkumuliert im Zellkern und bindet in Form eines Tetramers an definierte Konsensus-DNA-Sequenzen. Als Transkriptionsfaktor ist p53 in der Lage die Transkription von über 100 Zielgenen zu aktivieren beziehungsweise zu hemmen. Über 80% der p53-Mutationen, die in humanen Tumoren gefunden wurden, kommen in der zentralen Region des p53 vor, in der die DNA-Bindedomäne lokalisiert ist (Olivier, 2002). Mutationen im p53-Gen reduzieren die Genauigkeit in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

Genomische Instabilität ist die Hauptursache der Entwicklung von Tumoren. Somit ist die Lebensdauer von Menschen und Mäusen mit p53-Defekten in der Keimbahn durch Krebsentstehung limitiert (Malkin, 1990 und Donehower, 1992).

Des Weiteren wurde für die zentrale Domäne des Wildtyp-p53 (Wtp53) eine Mg^{2+} -abhängige 3'→5'-Exonuklease-Aktivität beschrieben, welche durch die basische C-terminale Region negativ reguliert wird (Mummenbrauer, 1996 und Janus, 1999). Die zytoplasmatische Wt-Form des p53-Proteins besitzt im nicht-induzierten Zustand ebenfalls eine intrinsische 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und ist somit funktionell aktiv (Lilling, 2003). Die Interaktion des p53-N-Terminus mit dem mitochondrialen Einzelstrang-Bindeprotein verstärkt die intrinsische 3'→5'-Exonuklease-Aktivität des p53. Dies deutet auf eine mögliche Involvierung des p53-Proteins in die DNA-Reparatur in Mitochondrien in Folge von oxidativem Stress hin (Wong, 2009).

1.2.1.1 Eliminierung tumorigener Zellen durch p53

1.2.1.1.1 Einleitung der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, hängt von der Aktivierung einer Reihe von Cystein-Proteasen, sogenannten Caspasen, ab. Abhängig von den initialen Signalen, kann die Apoptose entweder durch einen intrinsischen oder einen extrinsischen Signalweg ausgelöst werden (Abbildung 1.2) (Jin, 2005).

Der extrinsische Signalweg, der auch Death (Todes)-Rezeptor-Signalweg genannt wird, benötigt eine Liganden-abhängige Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren zur Einleitung der Apoptose. Die Ligandenbindung stimuliert die Assemblierung des Tod-induzierenden Signal-Komplexes (DISC) am zytoplasmatischen Teil des aktivierten Rezeptors, welcher aus Adaptorproteinen und der Pro-Caspase 8 besteht. Die Formation des DISC führt zur Oligomerisierung und Aktivierung der Initiator-Caspase 8. Die Caspase 8 spaltet und aktiviert daraufhin nachgeschaltete Effektor-Caspasen, die wiederum Substrate spalten und somit den Zelltod verursachen.

Der intrinsische Signalweg führt zur Induktion der Apoptose durch die Zerstörung der mitochondrialen Funktion. Mitglieder der proapoptotischen Bcl-Proteinfamilie akkumulieren als Antwort auf apoptotische Stimuli, zerstören die Mitochondrienmembran und führen somit zur Freisetzung des Cytochrom C. Zytoplasmatisches Cytochrom C ermöglicht die Ausbildung des Apoptosoms, das aus Cytochrom C, der Procaspase 9 und dem Apoptotische Protease Aktivierender Faktor-1 (APAF-1) besteht. Die Formation des Apoptosoms führt zur Aktivierung der Initiator-Caspase 9.

Die Caspase 9 spaltet und aktiviert die Effektor-Caspasen, die wiederum ihre Substrate spalten und die Apoptose zur Folge haben.

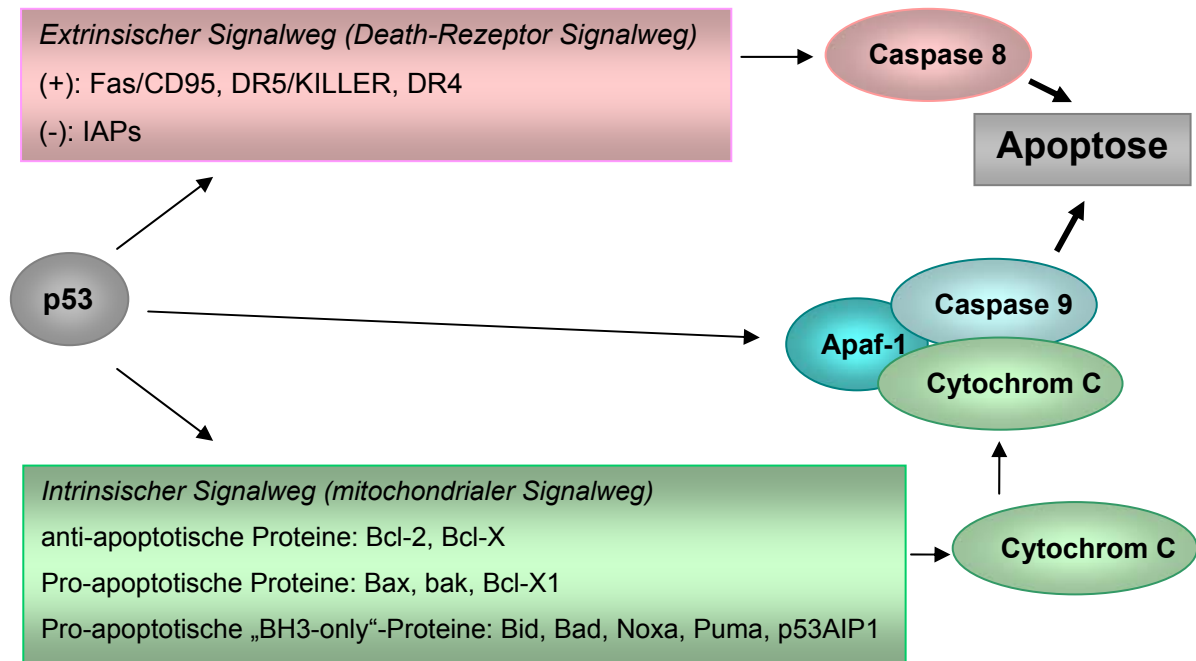


Abbildung 1.2: p53-abhängige Apoptose-Signalwege

(modifiziert nach Bai, 2006)

Unter Umständen extremer DNA-Schädigung stimuliert die p53-abhängige Transkription die Apoptose. Das p53-Protein begünstigt den extrinsischen Apoptose-Signalweg durch die vermehrte Expression des TRAIL-Rezeptors, des Death-Rezeptor-4 (DR-4) und des Death-Rezeptor-5 (DR-5, KILLER) (Jin, 2005). Des Weiteren werden der Fas-Rezeptor (CD95) und der FAS/APO-1-Ligand verstärkt exprimiert (Owen-Schaub, 1995). Darüber hinaus ist p53 in der Lage, den intrinsischen Apoptoseweg durch verschiedene Mechanismen zu aktivieren. Beispielsweise induziert p53 die Gen-Expression von Mitgliedern der pro-apoptotischen Bcl-2-Familie, wie beispielsweise *Bax*, *PUMA* und *NOXA*. Weiterhin verstärkt p53 die Expression des *APAF-1* und des *p53AIP1*, die den Zelltod durch den intrinsischen Signalweg fördern (Harms, 2004). Neben der Transkriptions-abhängigen Funktion spielt p53 auch eine direkte Rolle in der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs. Durch Translokation an das Mitochondrium und die Freisetzung von Cytochrom C begünstigt p53 die Apoptose (Mihara, 2003).

1.2.1.1.2. Seneszenz und Differenzierung

Die zelluläre Seneszenz kann durch DNA-Schäden und die Aktivierung von Onkogenen ausgelöst werden. Senescente Zellen sind charakterisiert durch einen permanenten Zellzyklusarrest, ein verändertes transkriptionelles Programm, eine große, flache Morphologie und ein Unvermögen ihre DNA zu replizieren. Das p53-Protein reguliert sowohl die replikative Seneszenz als auch die frühzeitige Seneszenz. Die replikative Seneszenz wird durch telomere Signale aktiviert und durch den p53-p21-Rb-Signalweg vermittelt. Sowohl p53, das am Ser¹⁵ phosphoryliert ist, als auch p21 akkumulieren während der replikativen Seneszenz. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Verkürzung der Telomere ein DNA-Schadens-Signal, ähnlich dem von DNA-Doppelstrangbrüchen, auslöst (d'Adda di Fagagna, 2003). Im Unterschied dazu wird frühzeitige Seneszenz als Antwort auf nicht-telomere Signale, wie beispielsweise DNA-Schäden, Aktivierung von Onkogenen oder reaktive Sauerstoff-Spezies, eingeleitet. Nicht-telomere Signale aktivieren sowohl den p53-p21-Rb-Signalweg als auch den p16-Rb-Signalweg, um Seneszenz auszulösen (Dimri, 2005).

Die Differenzierung ist ein weiterer Weg, mit dessen Hilfe p53 geschädigte Zellen aussondert. Stammzellen besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, sind resistent gegen Zellzyklusarrest und Apoptose und stellen aufgrund dessen primäre Ziele für die Tumorentstehung dar. Das p53-Protein unterstützt die Differenzierung von Stammzellen zu einem schwach malignen Zelltyp, der aber noch zu Zellzyklusarrest und Apoptose befähigt ist. Nach DNA-Schädigung unterdrückt p53 die Transkription von Nanog, einem Protein, das für die Stammzell-Erneuerung notwendig ist (Lin, 2005). Da Zellen den Zellzyklus verlassen müssen um zu differenzieren, ermöglicht ein p53-vermittelter Zellzyklusarrest die Förderung der Differenzierung. Das p21-Protein spielt eine Rolle in der Differenzierung und wirkt möglicherweise bei dem initialen Zellzyklusarrest mit. Am Beginn der Keratinozyten-Differenzierung wird p21 verstärkt, bei der terminalen Differenzierung aber vermindert, exprimiert (Di Cunto, 1998). Aufgrund dessen zeigt die vermehrte Expression von p21, ausgelöst durch p53 nach DNA-Schädigung, die Möglichkeit zur Zell-Differenzierung. Trotz nachgewiesener negativer Beeinflussung der Nanog-Expression und positiver Beeinflussung der p21-Expression, bleibt der Einfluss des p53-Proteins auf die Differenzierung noch kontrovers.

1.2.1.2 p53 und Signalwege zum Fortbestand der Zelle

1.2.1.2.1 Zellzyklusarrest

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch die G0-, G1-, S- und G2/M-Kontrollpunkte vermittelt (Abbildung 1.3). Während der frühen Antwort auf DNA-Schädigung initiiert der ATM/ATR-Signalweg einen transienten Zellzyklusarrest (Lukas, 2004). Das p53-Protein wird infolgedessen durch DNA-Schadens-Kinasen aktiviert und die durch p53 induzierten Gene sind notwendig für einen andauernden Zellzyklusarrest. Die Blockierung des Zellzyklus durch p53 ist notwendig, um der Zelle Zeit für die Reparatur der geschädigten DNA zu geben und verhindert somit die Anhäufung von Defekten der DNA.

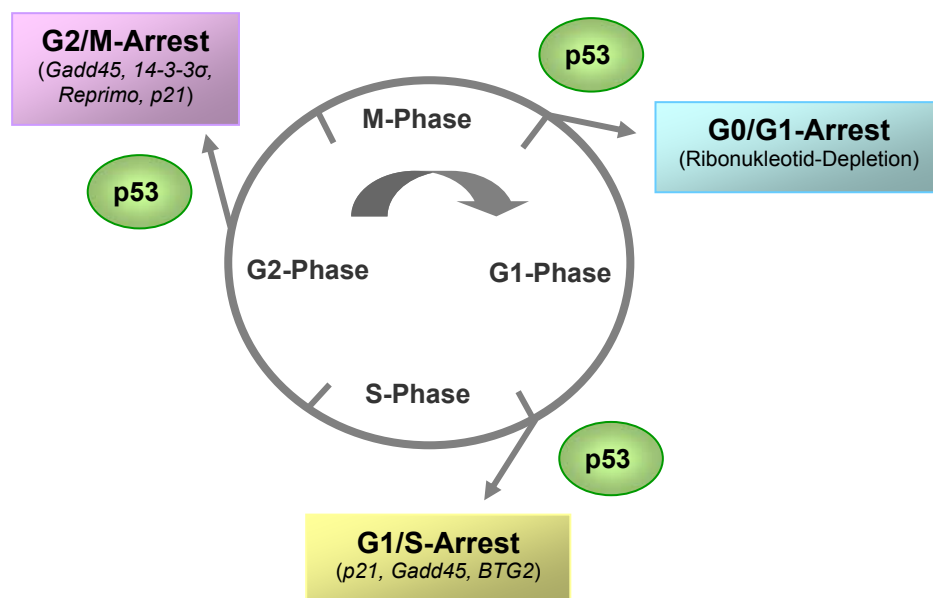


Abbildung 1.3: p53-vermittelter Zellzyklusarrest

(Literaturquellen siehe Text)

Der Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase ist essentiell für die genomische Integrität, da er den Eintritt in die S-Phase blockiert und somit die Replikation geschädigter DNA verhindert. Unter normalen Bedingungen wird der Verlauf des Zellzyklus durch die G1-Phase von Zyklinen des D- und E-Typs und deren assoziierte Zyklin-abhängige Kinasen (Cdk2, Cdk4, Cdk6) vermittelt. In Folge der Schädigung von DNA wird p53 aktiviert, welches wiederum die Expression von $p21^{WAF1/CIP1}$ induziert, das einen Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen darstellt (Weinberg, 2002). Das p21-Protein hält den G1-Arrest aufrecht, indem es die Aktivität der Kinasen Cdk2 und Cdk4 inhibiert. Neben p21, dem primären Regulator des p53-vermittelten G1-Arrests,

sind auch weitere p53-Zielgene, wie beispielsweise *GADD45* und *BTG2*, in die Aufrechterhaltung des G1-Arrests involviert. Das GADD45-Protein bindet an PCNA und inhibiert somit den Eintritt in die S-Phase (Kastan, 1992), während BTG2 Cyclin B1-Cdc2 inhibiert (Rouault, 1996).

Die DNA ist in der S-Phase, in der die Replikation der Chromosomen stattfindet, besonders anfällig für Schädigungen. Aufgrund dessen schützen zwei Kontrollpunkte die Zelle während der S-Phase: der intra-S-Kontrollpunkt und der Replikations-Kontrollpunkt. Der intra-S-Kontrollpunkt wird durch DNA-Schädigung während der S-Phase aktiviert. Eine p53-Isoform, $\Delta p53$, die durch alternatives Splicen der Exons 7-9 entsteht, was zur Deletion eines Teils der DNA-Binderegion des p53 führt, initiiert den intra-S-Arrest durch Induktion von p21 und 14-3-3 δ (Rohaly, 2005). Der Replikations-Kontrollpunkt verhindert den Zusammenbruch der Replikationsgabel, wenn die DNA-Polymerase an DNA-Läsionen stoppt. Falls es nicht rechtzeitig zur Reparatur der DNA kommt, bricht die Replikationsgabel zusammen und hinterlässt einen DNA-Doppelstrangbruch. Das ATR/ATRIP- Heterodimer und Rad17 lokalisieren am Ort der DNA-Schädigung. ATR aktiviert die Chk1, welche wiederum ein Anhalten der DNA-Replikation bewirkt (Lukas, 2004). Obwohl p53 durch ATR und Chk1 phosphoryliert und stabilisiert wird, scheint das Volllängen-p53-Protein nicht am S-Phase-Arrest beteiligt zu sein. Stattdessen schützt p53 die genomische Integrität während der S-Phase, indem es die DNA-Reparatur begünstigt.

Der G2/M-Kontrollpunkt spielt eine weitere Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms, indem er die Segregation geschädigter Chromosomen verhindert. Um einen G2/M-Arrest zu initiieren, muss die Aktivität des Cdc2-Cyclin B-Komplexes inhibiert werden. Das p53-Protein reguliert eine Anzahl von Genen, die in den G2/M-Arrest involviert sind, wie beispielsweise *p21*, dessen Genprodukt das Überschreiten des G2/M-Kontrollpunkts durch die Bindung an Cdc2-CyclinB blockiert und somit die aktivierende Phosphorylierung des Cdc2 am Thr¹⁶¹ durch CAK verhindert (Smits, 2000). Des Weiteren induziert p53 die Expression des 14-3-3 δ -Proteins, das den Eintritt in die Mitose-Phase blockiert, durch Aktivierung der Wee-Kinase1, welche zur Sequestrierung der Cdc25C-Phosphatase im Zytoplasma führt (Hermeking, 2006). Weitere Proteine deren Gene durch p53 aktiviert werden, wie beispielsweise GADD45 (Kastan, 1992) und Reprimo (Ohki, 2000), sind einbezogen in die Aufrechterhaltung des G2/M-Kontrollpunkts. Darüber hinaus ist p53 Teil eines Erkennungsmechanismus', der einen reversiblen G₀/G₁-Arrest als Antwort auf die

Depletierung des Pools an Ribonukleotiden, in Abwesenheit detektierbarer DNA-Schäden, vermittelt (Linke, 2009).

1.2.1.2.2 DNA-Reparatur

Verschiedene Einflüsse, wie beispielsweise Chemotherapeutika, chemische Karzinogene, γ -Strahlung, ultraviolette Strahlung (UV), ROS und endogene Stress-Faktoren führen zur Schädigung der DNA. Das Fehlschlagen der DNA-Reparatur resultiert im Zelltod oder in onkogener Transformation der Zelle. Je nach Art der Schäden verwenden eukaryotische Zellen verschiedene Mechanismen zur Reparatur der DNA, wie z.B. NER, BER, MMR, TLS, HR und NHEJ. Das p53-Protein fördert die genomische Integrität, indem es die DNA-Reparatur durch die Aktivierung verschiedener Zielgene reguliert (Tabelle 1.4). Weiterhin moduliert p53 die DNA-Reparatur direkt über einen Transkriptions-unabhängigen Weg.

Protein (Gen)	Mechanismus	Referenz
<u>Globale genomische Reparatur (GGR)</u> XPC DDB2 (XPE)	<ul style="list-style-type: none"> - Teil des Initiationskomplex für die GGR - wird benötigt für die DNA-Bindung von DDB1 - rekrutiert XPC an UV-induzierte Läsionen 	Adimoolam, 2002 Hwang, 1999 / Fitch, 2003 / Wang, 2004 ¹
<u>Mismatch-Reparatur (MMR)</u> MLH1 MSH1 PCNA PMS2	<ul style="list-style-type: none"> - rekrutiert weitere Reparaturenzyme - erkennt Fehlpaarungen - unterstützt die Reparatur fehlgepaarter Basen durch MSH2 - Sensor von DNA-Schädigungen - stabilisiert p73 und aktiviert Apoptose 	Chen, 2005 Scherer, 2000 Xu, 1999 Shimodaira, 2003 / Chen, 2005
<u>Transläsionale Synthese (TLS)</u> DNA Pol η	<ul style="list-style-type: none"> - Überbrückung von Thymidindimeren während der Replikation - fungiert in der p53 Aktivierung 	Johnson, 1999 / Masutani, 1999 / Liu, 2006
<u>Homologe Rekombination (HR)</u> Rad51 DNA Pol η RECQ4 WRN	<ul style="list-style-type: none"> - Transkription wird durch p53 unterdrückt - fördert die Strang-Invasion - bindet Rad51, erweitert den eindringenden Strang, startet die Replikation nach der HR neu - Transkription wird durch p53 gehemmt - Transkription wird durch p53 und SP1 gehemmt 	Arias-Lopez, 2006 Kawamoto, 2005 / McIlwraith, 2005 / Liu, 2006 Sengupta, 2005 Yamabe, 1998
<u>Sonstige DNA-Reparatur-Mechanismen</u> GADD45A p53R2	<ul style="list-style-type: none"> - bindet und begünstigt den Zugang zu DNA-Läsionen - trägt zur genomischen Stabilität in der Maus bei - stellt dNTPs für die DNA-Synthese und Reparatur bereit - schützt vor Strahlungs-induzierter Mutagenese 	Kastan, 1992 / Carrier, 1999 / Hollander, 1999 / Tanaka, 2000 / Tsai, 2006

Tabelle 1.4: p53-abhängige Regulierung der Expression von DNA-Reparatur-Genen
(nach Helton, 2007)

1.2.2 Regulation des p53-Proteins

Eine Vielzahl verschiedener Stress-Faktoren führt zur Stabilisierung und Aktivierung des p53. Die Stabilisierung des p53-Proteins umfasst eine Reihe von Phosphorylierungen, sowohl am p53-Protein als auch am Mdm2, welche die Dissoziation des p53/Mdm2-Komplexes, der hauptsächlich dafür verantwortlich ist p53 unter Kontrolle zu halten, fördern (Haupt, 1997). Zusätzlich beeinflussen weitere Proteine die Stabilität des p53.

1.2.2.1 Posttranslationale Modifikationen

Der Hauptteil der Modifikationsstellen des p53 befindet sich sowohl innerhalb der ersten 40 AS des N-Terminus, einer Region, die für die transaktivierende Funktion und die Bindung von Mdm2 verantwortlich ist, als auch in der C-terminalen regulatorischen Region. Diese posttranslationalen Modifikationen beinhalten Phosphorylierungen (Tabelle 1.5), Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitinierungen, Glykosylierung, Neddylierung und Sumoylierungen.

Phosphorylierungsstellen des p53	S6	S9	S15	T18	S20	S33	S37	S46	T81	T155	T315	S376	S392
<u>Genotoxischer Stress:</u>													
Topo II - Inhibitor	x	x	x		x			x			x		x
NO			x		x	x		x			x		x
H ₂ O ₂		x	x		x								
UV	x	x	x		x	x	x	x	x		x		x
IR	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		
<u>Nicht-genotoxischer Stress:</u>													
Mikrotubuli-Zerstörung	x					x		x			x		x
Frühzeitige Seneszenz						x		x					
Osmotischer Schock						x							
Schwerwiegende Hypoxie			x		x		x						
Replikative Seneszenz			x	x				x			x	x	

Tabelle 1.5: Posttranslationale Modifikationen des p53 als Antwort auf verschiedene genotoxische und nicht-genotoxische Stressfaktoren

Die angezeigten Modifikationen sind Phosphorylierungen an Serinen (S) und Threoninen (T) des p53-Proteins (nach Lavin, 2006).

Humanes p53 besitzt etwa 23 verschiedene Phosphorylierungsstellen für Stress-aktivierte Proteinkinasen, die DNA-abhängige Proteinkinase, die Caseinkinase I und II und Cyclin-abhängige Kinasen. Obwohl die genaue Funktion spezifischer Phosphorylierungen an verschiedenen Stellen nach wie vor umstritten ist, gibt es Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung des p53-Proteins, durch Unterstützung der Dissoziation von Mdm2, zu dessen Stabilisierung beiträgt und die transkriptionelle Aktivität des p53 verstärkt. Die ATM- und ATR-Kinasen phosphorylieren humanes p53 an den Serinen 15 und 20, die für die Aktivierung des p53 nach DNA-Schädigung essentiell sind (Banin, 1998 und Canman, 1998). Die ATM-abhängige Phosphorylierung des Ser²⁰ wird durch Chk2 vermittelt (Wang, 2004²). Die DNA-PK phosphoryliert p53 am Ser¹⁵, das in der N-terminalen Region liegt, welche die Interaktion des p53 mit der Transkriptionsmaschinerie und dem Mdm2-Protein kontrolliert. Des Weiteren phosphoryliert die DNA-PK die AS Ser⁹ und Thr¹⁸ des p53 (Soubeyrand, 2004). Die Phosphorylierung verschiedener Stellen des p53-N-Terminus führt zur Dissoziation des Mdm2/p53-Komplexes. Dies stimuliert das Potential des p53-Proteins zur Regulierung der Transkription seiner Zielgene.

Die komplexe Kontrolle der p53-Stabilisierung und Aktivierung als Antwort auf Stress-Stimuli schließt die direkten Phosphorylierungen von p53, Chk2, Mdm2 und MdmX durch die ATM-Kinase ein. Des Weiteren vermittelt ATM seine Effekte über Chk2 und weitere Kinasen. Ein zusätzlicher Faktor ist die Art des Stresses, da ATM primär als Antwort auf Doppelstrangbrüche agiert. Weitere Arten von DNA-Schäden können zur Aktivierung zusätzlicher Kinasen, wie z.B. ATR, JNK, c-Abl, PI3-Kinase und Akt, führen, die alle die Stabilität und Aktivität des p53-Proteins beeinflussen. Der komplexe Prozess der p53-Aktivierung ist präzise abgestimmt, um sicherzustellen, dass dieses Protein unter stressfreien Bedingungen in einem latenten Zustand vorliegt und ausschließlich mit der entsprechenden Resonanz aktiviert wird (Lavin, 2006).

1.2.2.2 Abbau des p53-Proteins

Die Menge des p53-Proteins in nicht-malignen Zellen ist, mit etwa 5000 Molekülen pro Zelle, im Vergleich zu Tumorzellen, mit etwa 100000 p53-Molekülen, gering und wird überwiegend über seine Abbaurate und weniger über die Translation der mRNA festgelegt (Agrawal, 1994). Der p53-Abbau wird durch eine autoregulatorische Feedback-Schleife in Form von drei Ubiquitin-Ligasen, Mdm2, Pirh2 und Cop-1,

ermöglicht (Harris, 2005). Die Bindung von Mdm2 an p53 reguliert dessen Aktivität, indem es p53 für den Abbau markiert (Abbildung 1.6) und somit p53-induzierte Prozesse, wie Zellzyklusarrest und Apoptose, inhibiert.

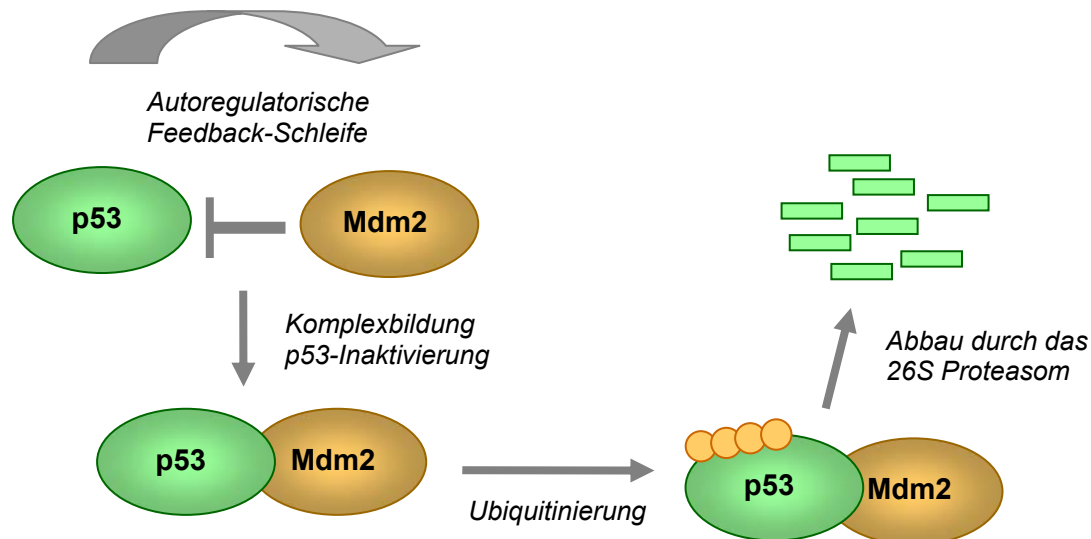


Abbildung 1.6: Regulierung des p53-Abbaus durch Mdm2

Mdm2 bindet p53 und monoubiquitinyliert es vor dem Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo es polyubiquitinyliert und somit zum Abbau durch das 26S-Proteasom markiert wird. Die N-terminale p53-Domäne initiiert in einer schnellen ersten Phase Ubiquitin-unabhängig den Abbau des p53 durch das 20S-Proteasom, während in einer langsameren zweiten Phase das p53-Protein Ubiquitin-abhängig durch das 26S-Proteasom abgebaut wird (Haupt, 1997 und Tsvetkov, 2009).

Die NAD(H)-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1), ein p53-interagierendes Protein, ist in der Lage, den proteasomalen Abbau des p53 zu verhindern (Asher, 2002). Durch DNA-Schädigung oder andere Stressoren kommt es zur Aktivierung von PI3-ähnliche Kinasen, wie beispielsweise ATM und ATR, die p53 durch die Reduktion der Interaktion mit Mdm2 stabilisieren. Der Nukleolus agiert als Stress-Sensor, indem er Nucleophosmin, einen negativen Regulator des Mdm2/p53-Komplexes, ausschüttet. Das PML-Protein führt zur Stabilisierung des p53, indem es Mdm2 im Kern sequestriert. Mdm2 wird als Antwort auf DNA-schädigende Agensien rapide durch ATM phosphoryliert (Khosravi, 1999). Die phosphorylierte Form des Mdm2 ist, im Vergleich zur nicht-phosphorylierten Mdm2-Variante, vermindert in der Lage, den nukleo-zytoplasmatischen Transport des p53-Proteins durchzuführen. Dies lässt

darauf schließen, dass die Mdm2-Phosphorylierung die Interaktion mit p53 abschwächt.

Pirh2 interagiert mit p53 und fördert dessen Ubiquitinylierung unabhängig von Mdm2 (Leng, 2003). Cop-1 verstärkt den p53-Umsatz, indem es p53 Ubiquitin-abhängig für den proteasomalen Abbau markiert (Dornan, 2004).

1.2.3 Die Prolin-reiche Domäne

Aus der unter 1.2.1. beschriebenen Domänenstruktur des p53-Proteins soll im folgenden nur die sogenannte Prolin-reiche Domäne genauer beschrieben werden, da ihr Bezug auf die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten die höchste Relevanz zukommt.

Die Polyprolin-Region ist im N-terminalen Bereich, AS 62-92 (Abbildung 1.7), des p53-Proteins lokalisiert, enthält fünf teilweise konservierte PXXP-Motive (P bezeichnet Prolin und X jede AS) und hat einen bedeutenden Einfluss auf die Wachstums-unterdrückende Funktion des p53-Proteins (Walker, 1996).

p53 (Mensch): 62-EAPRMPEAAP**P/R**VAPAPAAPTPAAPAPAPSWP-92

Abbildung 1.7: Aminosäuresequenz der Prolin-reichen Region des p53

Die Polyprolin Region (AS 62-92) beinhaltet 12 Proline (P) und 5 PXXP-Motive. Der AS-Poly-morphismus an der Stelle 72 Pro/Arg (P/R) ist orange dargestellt.

Die Phosphorylierung von Proteinen an Serin- oder Threonin-Resten, die Prolinen vorausgestellt sind (Ser/Thr-Pro), spielt eine essentielle Rolle in der Regulation diverser zellulärer Prozesse, beispielsweise dem Fortschreiten des Zellzyklus'. Die Prolyl-Isomerase Pin1 interagiert mit den Ser^{33/46}-Pro-Sequenzmotiven des p53 und reguliert dessen Stabilisierung sowie die transkriptionelle Aktivität nach DNA-Schädigung (Wulf, 2002). Des Weiteren resultiert die Mutation des Prolin 82 in einer Verminderung der Aktivierung des p53 durch Pin1 und Chk2 als Antwort auf DNA-Schäden (Berger, 2005).

Nach genotoxischem Stress bindet p53 vermehrt an die nukleare Matrix, wobei die Prolin-reiche Region des p53 in die Bindung involviert ist (Jiang, 2001). Des Weiteren interagiert der transkriptionelle Corepressor mSin3a mit der Prolin-reichen Region des p53 (AS 61-75). Die Interaktion mit mSin3a schützt p53 vor dem Mdm2-

vermittelten proteasomalen Abbau und führt somit zur Stabilisierung des p53-Proteins (Zilfou, 2001). Ferner bindet die FAK den Bereich der AS 65-71 der Prolin-reichen Region des p53. Die Mutation dieser Bindestelle kehrt den hemmenden Effekt der FAK auf die p53-vermittelte Transaktivierung der *p21*-, *Bax*- und *Mdm2*-Promotoren um (Golubovskaya, 2008). Die Polyprolin-Region ist darüber hinaus von Bedeutung in der Modulierung der inhibitorischen Effekte des Mdm2-Proteins auf die Aktivität und Stabilität des p53. Der inhibitorische Einfluss des Mdm2-Proteins, sowohl auf die apoptotische Aktivität als auch auf die transkriptionelle Aktivität des p53, ist höher für eine p53-Variante, die keine Prolin-reiche Region besitzt (p53 Δ pro), als für die Wt-p53-Form (Berger, 2001).

Der konkrete Beitrag der Polyprolin-Domäne in der Regulation und Funktion des p53 ist nach wie vor unklar. Mutationen in der Polyprolin-Region vermindern die apoptotische Funktion des p53 und die Deletion der Prolin-reichen Region führt zu einer verstärkten Sensibilisierung des p53-Proteins für den Mdm2-vermittelten Abbau über einen bisher unbekannten Mechanismus. Eine Deletion der Prolin-reichen Region beeinträchtigt die Fähigkeit des p53-Proteins, Apoptose zu induzieren. Das Vermögen des p53 Wachstumsarrest zu induzieren, ist nicht beeinträchtigt (Sakamuro, 1997). Durch die Deletion der Prolin-reichen Region kommt es zu einer Verringerung der Expression verschiedener apoptotischer Gene, wie beispielsweise *PIG3*, *PIG6*, *PIG11*, *p85*, *BTG2*, die in die zelluläre apoptotische Antwort auf oxidativen Stress involviert sind. Die Induktion weiterer apoptotischer Gene, wie *bax* und *KILLER/DR5*, wird nicht beeinflusst (Zhu, 1999). Die Prolin-reiche Region zeigt ferner einen Einfluss auf den durch Gas-1, ein in der G0-Phase stark exprimiertes Plasmaprotein, vermittelten Wachstumsarrest (Ruaro, 1997).

Neben den bisher bekannten Mechanismen, welche die p53-Funktion regulieren, gibt es auch Anzeichen, dass genetische p53-Polymorphismen Einfluss auf dessen Funktion haben. Humanes p53 besitzt einen Arg/Pro-Polymorphismus am Aminosäurerest 72 (Matlashewski, 1987). Die zwei polymorphen Varianten des Wt-p53 zeigen unterschiedliche biochemische Eigenschaften, wie beispielsweise die Bindung an die Komponenten der Transkriptionsmaschinerie. Dies beeinflusst wiederum die Transkriptions-aktivierende Funktion beider p53-Varianten. Die Pro-Variante ist ein wirksamerer Transkriptionsaktivator (Thomas, 1999), ein potenter Induktor des Zellzyklusarrest (Pim, 2004) und effizienter in der DNA-Reparatur (Siddique, 2006) als die Arg-Variante. Im Gegensatz dazu ist die Arg-Variante, im

Vergleich zur Pro-Variante, potenter in der Zelltod-Induktion, da sie effektiver an Mitochondrien lokalisiert und somit Apoptose einleitet (Dumont, 2003 und Sullivan, 2004). Beide polymorphe Varianten des p53 haben somit im Laufe der Evolution eine spezifische Regulierung unterschiedlicher zellulärer Funktionen entwickelt.

Gesunde heterozygote asiatische Menschen (Arg/Pro) exprimieren bevorzugt die Pro-Variante auf der mRNA-Ebene. Im Gegensatz dazu wird das Arg-Allel vorzugsweise bei heterozygoten asiatischen Brustkrebspatienten exprimiert (Siddique, 2005). Einblicke in die Rolle des p53-72Arg/Pro-Polymorphismus in der Alterung konnten von Studien menschlicher Populationen abgeleitet werden. Menschen, die eine oder zwei Kopien der Pro- oder Arg-p53-Form tragen, wurden hinsichtlich der Prädisposition für Krebs und der Überlebensrate untersucht. Diese Resultate bekräftigen die These einer Involvierung des p53-Proteins in der Regulierung der Lebenserwartung. Der Pro/Pro-Genotyp besitzt ein höheres Risiko Krebs zu entwickeln als der Arg/Arg-Genotyp. Die Arg-Form ist ein potenterer Induktor von Apoptose im Vergleich zur Pro-Form. Eine prospektive Studie mit 1226 Probanden im Alter von 85 oder älter, zeigte für die Pro/Pro-Träger, im Vergleich zu den Arg/Arg-Trägern, eine 41% höhere Überlebensrate, trotz einer 2.5-mal höheren Krebssterblichkeit. Somit schützt die Arg-Form effizienter vor Krebs als die Pro-Form, aber auf Kosten einer reduzierten Lebensdauer (Dumont, 2003; Bonafe, 2004 und van Heemst, 2005). Träger einer p53-Form, die ein schwächerer Apoptose-Induktor ist, haben eine größere Überlebensrate nach zellulärem Stress. Dies zeigt, dass eine starke p53-Aktivität beim Menschen nachteilig sein kann.

1.2.4 Regulation der p53-Funktion durch Änderungen in der Proteinfaltung

Da p53 ein Multidomänenprotein ist, teilweise umfangreiche unstrukturierte, flexible Regionen enthält und eine geringe Gesamtstabilität besitzt, kann es einer Gruppe locker gefalteter und teilweise unstrukturierter Proteine zugeordnet werden. Das Konzept dieser intrinsisch flexiblen Proteingruppe korreliert eng mit der Vielfalt verschiedener Bindungsmodi und infolge dessen der Potenzierung von Protein-Protein-Interaktionen (Wright, 1999). Als strukturell flexibles Protein zeigt p53 die Grundvoraussetzungen zur Integration einer Vielzahl von Signalen in der Entscheidung zwischen Zellteilung und Apoptose.

Das p53-Protein besitzt eine geringe Halbwertszeit von etwa 30 bis 60 min *in vivo* (Maki, 1997). Vor dem Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg ist eine Entfaltung

des Proteins notwendig. Als instabiles Protein entfaltet sich p53 *in vitro* leicht. *In vivo* befindet sich p53 in einem Gleichgewicht zwischen einem gefalteten, funktionellen Zustand und einem ungefalteten Zustand, in dem das Protein empfänglich für den Abbau ist (Bell, 2002). Die Faltung der strukturierten Segmente wird möglicherweise durch post-translationale Modifikationen und die Interaktion mit weiteren Proteinen wie Mdm2 und molekularen Chaperonen induziert (Kussie, 1996).

Auch die Tetramerisierung des p53 in einen aktiven Transkriptionsfaktor kann durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise die Kommunikation innerhalb der verschiedenen Proteindomänen, vermittelt werden. Diese kann wiederum durch Phosphorylierungen, die Interaktion mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie und Komponenten des Mdm2-abhängigen proteasomalen Signalwegs reguliert werden. Natürlich vorkommende Punktmutationen innerhalb des p53-Proteins, die in humanen Tumoren festgestellt wurden, inaktivieren die Sequenz-spezifische DNA-Bindung durch Änderungen der Faltung der zentralen Domäne (Olivier, 2002). Dies kann wiederum die Interaktion der zentralen Domäne mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie beeinflussen.

1.3 Molekulare Chaperone - Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen

Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPlasen) gehören zur Enzymgruppe der Isomerasen und werden auch Immunophiline oder Rotamasen genannt. 1984 wurde die erste PPlase aus der Nierenrinde des Schweins isoliert (Fischer, 1984). PPlasen katalysieren die *cis/trans*-Umwandlung von Prolin-Imid-Peptidbindungen (Abbildung 1.8) und spielen eine essentielle Rolle bei der Proteinfaltung (Fischer, 2003). Zusätzlich zu ihrer Rolle als Katalysatoren der Proteinfaltung wird ihnen eine Mitwirkung in der Assemblierung von Multidomän-Proteinen und bei der zellulären Signaltransduktion zugeschrieben (Göthel, 1999).

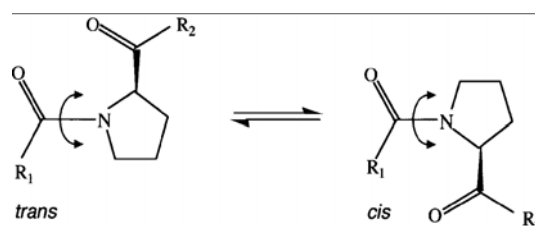


Abbildung 1.8: *cis/trans* Isomerisierung von Peptidyl-prolyl Bindungen

Zur Gruppe der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen gehören die Cyclophiline, die FK-506-Bindeproteine, die das Immunsuppressivum FK-506 binden, und die Parvuline (Schiene, 2000). Zwei essentielle homologe Parvuline sind in eukaryotischen Zellen bekannt: das humane Protein Pin1 und das Homologe in der Hefe Ess1. Beide Proteine agieren als Regulatoren des mitotischen Zellzyklus. Das humane Parvulin-Homologe Pin1 ist ein mitotischer Regulator, der essentiell für den G2/M-Übergang des eukaryotischen Zellzyklus ist (Lu, 1996). Pin1 assoziiert mit p53 nach DNA-Schädigung und begünstigt die p53-Stabilisierung (Wulf, 2002). Des Weiteren ist Pin1 in der Lage, mit Hilfe seiner PPlase-Aktivität, die Polyubiquitinierung des p53-Proteins zu stimulieren. Dies erfolgt möglicherweise über eine Änderung der Affinität von Ubiquitin-Ligasen, aufgrund von Prolyl *cis/trans* Isomerisierungen innerhalb ihrer Substrat-Proteine (Siepe, 2009).

1.3.1 Cyclophiline

Cyclophiline wurden ursprünglich als zelluläre Bindeproteine für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) detektiert (Handschuhmacher, 1984) und besitzen Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase-Aktivität (Fischer, 1989).

Die Cyclophiline kommen in Säugetieren, Pflanzen, Insekten, Pilzen und Bakterien vor und sind durch die Evolution strukturell konserviert. Beim Menschen wurden bisher 16 verschiedene Cyclophiline gefunden. Alle Cyclophiline besitzen eine gemeinsame Domäne von etwa 109 Aminosäuren, die Cyclophilin-ähnliche-Domäne (CLD). Diese CLD wird von weiteren Domänen, die für die jeweiligen Cyclophiline spezifisch und mit der subzellulären Kompartimentierung und funktionellen Spezialisierung assoziiert sind, umgeben (Marks, 1996).

Cyclophiline sind multifunktionelle Proteine, die in die Proteinfaltung, die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion, HIV-Infektion, die Interaktion mit dem Plasmamembranprotein CD-147, das Immunsystem und die Apoptose involviert sind. Des Weiteren spielen Cyclophiline als molekulare Chaperone eine Rolle in der Reparatur von Proteinen, die aufgrund von Umwelt-Stressfaktoren, wie beispielsweise Wärme, UV-Strahlung, Änderungen des pH-Wertes der Umgebung und Behandlung mit Oxidanzien, geschädigt sind. Exogener Stress induziert die Expression von Cyclophilinen, die anschließend ihre Reparaturfunktionen ausüben können (Craig, 1993 und Parsell, 1993).

Zusätzlich zur Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase-Aktivität wurde eine Nuklease-Funktion für die Cyclophiline detektiert, die ähnlich der Aktivität der in die Apoptose involvierten Endonukleasen ist. Cyclophiline sind in der Lage, einzelsträngige, doppelsträngige und superspiralisierte DNA abzubauen. Sowohl Mg^{2+} - als auch Ca^{2+} -Ionen beeinflussen diese Eigenschaft der Cyclophiline (Montague, 1994). Somit existiert die Möglichkeit einer Involvierung der Nuklease-Aktivität von Cyclophilinen in den apoptotischen DNA-Abbau. In Zellkulturen endothelialer Zellen verhindert die Zugabe des Cyclophilin-Inhibitors Cyclosporin A die Einleitung der Apoptose durch Blockierung der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren, Stabilisierung der Mitochondrien und Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol (Walter, 1998). Die Freisetzung des Cytochrom C ist ein Auslöser der Aktivierung einer Kaskade apoptotischer Cystein-Proteasen (Caspasen) (Kroemer, 1995 und Li, 1997). Cyclophiline kommen intrazellulär vor, können aber auch von Zellen abgesondert werden. Sekretierte Cyclophiline besitzen Zytokin-Funktion. Sowohl Cyp 18 (Cyp A) als auch Cyp B sind in der Lage, die Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen auszulösen (Sherry, 1998 und Jin, 2000). Die Cyclophilin-Expressionsraten unterscheiden sich in Abhängigkeit der Lokalisation des Zelltyps und der Umweltbedingungen.

Die komplizierte Balance zwischen Zellteilung und Zelltod normaler Zellen verschiebt sich in Krebszellen hin zu kontinuierlichem Zellwachstum als Resultat der Expression anti-apoptotischer Proteine. In bestimmten Tumortypen werden Cyclophiline vermehrt exprimiert, wie beispielsweise Cyclophilin 18 in Lungentumoren (Campa, 2003). Die Expression und Funktion der Cyclophiline korreliert möglicherweise mit der Biologie verschiedener Krebsarten. Dieses Phänomen ist bereits für molekulare Chaperone beschrieben (Jolly, 2000).

Aufgrund der prominenten Eigenschaft von Krebszellen Zelltod-Resistenz zu besitzen, ist die Fähigkeit der Cyclophiline Zellen vor Apoptose zu schützen von Interesse für die weitere Forschung. Das Verständnis der Rolle der Cyclophiline bei der Krebsentstehung ist essentiell für die Festlegung klinischer Anwendungen zur Behandlung oder Diagnose dieser Krankheit.

1.3.1.1 Cyclophilin 18 (Cyp 18, Cyclophilin A)

Cyclophilin 18 (Cyp 18), ein 18 kDa schweres Protein, welches auch als Cyclophilin A (Cyp A) bezeichnet wird, stellt etwa 0.6% der Menge der zytosolischen Proteine

dar und ist hoch konserviert in Prokaryoten und Eukaryoten. Cyp 18 ist der wichtigste zelluläre Bindepartner, und somit Mediator, des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) (Handsuhmacher, 1984) (Abbildung 1.9). Cyclophilin 18 bildet einen ternären Komplex mit CsA und der Kalzium-Calmodulin-aktivierten Serin/Threonin-spezifischen Protein-Phosphatase Calcineurin. Die Inhibierung des Calcineurins blockiert die Translokation des nuklearen Faktors aktivierter T-Zellen aus dem Zytoplasma in den Zellkern und verhindert somit die Transkription von Zytokin-Genen, wie beispielsweise Interleukin-2 (Liu, 1991 und O'Keefe, 1992).

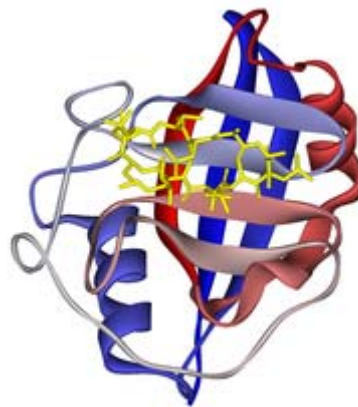


Abbildung 1.9: Komplex aus humanem Cyclophilin 18 und Cyclosporin A

Cyclosporin A ist in gelb dargestellt und Cyclophilin 18 in rot und blau.

(Quelle: RCSB Protein Data Bank: 1cwa)

Verschiedene Proteinfaltungsprozesse sind abhängig von der katalytischen Aktivität der Cyclophiline. Beispielsweise fördert Cyp 18 sowohl die Formation als auch die Infektivität des Virions des HIV-1 (Luban, 1993 und Zhao, 1997). Cyp 18 wird in das HIV-1 Virion eingebaut und interagiert dort mit dem HIV-1 Gag Protein, welches die Polyprotein-Vorstufe der Virus-Strukturproteine darstellt. Ein kleiner Bereich des HIV-1 Kapsidproteins, der vier konservierte Prolin-Reste enthält, ist entscheidend für den Einbau des Cyp 18 in das Virion (Franke, 1994).

Dem Cyp 18-Protein wird überdies eine Beteiligung an der Caspase-Aktivierung in Neuronen zugesprochen (Capano, 2002). Cyclophilin 18 ist in die nukleare Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) in Neuronen nach cerebraler Hypoxie-Ischämie involviert (Zhu, 2007) und kooperiert mit AIF während der Apoptose-assoziierten Lyse des Chromatins (Candé, 2004). Cyclophilin 18 zeigt eine mehr als 7-fache Überexpression in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs. Im Gegensatz dazu resultiert ein Cyp 18-Knockdown in Lungenkrebszellen in

inhibiertem Tumor-wachstum, verstärkter Apoptoserate und verminderter Zellteilungsrate (Howard, 2005). Obwohl Cyp 18 eine Funktion in der Apoptose zu haben scheint, ist noch nicht abschließend geklärt, ob es in die Aktivierung oder Inhibierung der Apoptose, oder in beides, involviert ist.

1.3.1.2 Der Cyclophilin 18-Inhibitor Cyclosporin A

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), ein zyklisches Peptid, bestehend aus 11 Aminosäuren (Abbildung 1.10), wird von dem norwegischen Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* (Gams) produziert. CsA bindet in das aktive Zentrum des Cyp 18-Enzyms und inhibiert dessen PPLase-Aktivität.

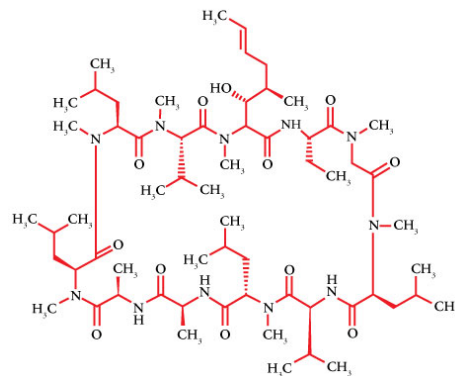


Abbildung 1.10: Strukturformel des Cyclosporin A

(Quelle: <http://structures.lclabs.com/chemStructures1/C-60000.JPG>)

Die Verwendung von Cyclosporin A, erstmalig 1978, hat die Transplantationsmedizin durch Erhöhung der Dauer des Transplantat-Fortbestands revolutioniert. Seit dessen Entdeckung wurde Cyclosporin A zudem zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, beispielsweise bei Hautfunktionsstörungen wie atopischer Dermatitis oder Psoriasis, auch außerhalb der Transplantationsmedizin eingesetzt. Der Schlüsselmechanismus der Cyclosporin A-vermittelten Immunsuppression ist die Inhibierung von Kalzineurin, eine Eigenschaft die es mit Tacrolimus und Pimecrolimus teilt. Heutzutage werden diese drei Kalzineurin-Inhibitoren zusammen mit dem Makrolid Rapamycin als Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin und der Dermatologie eingesetzt (Weischer, 2007). Seit seiner Verwendung in der Transplantationsmedizin zeigt CsA eine Anzahl von Nebenwirkungen, beispielsweise einen generellen Anstieg der Krebsrate. Bei 40% der Krebsarten, die

Transplantatpatienten nach einer immunsuppressiven Therapie mit CsA entwickeln, handelt es sich um Hautkrebs (Penn, 1986).

1.4 Zielstellung

Der Tumorsuppressor p53 zeigt, als Protein mit gegeneinander strukturell flexiblen Domänen, die Grundvoraussetzungen zur Integration einer Vielzahl von Signalen in der Entscheidung zwischen Zellteilung und Apoptose. Die Regulation des p53 durch die Interaktion mit weiteren zellulären Proteinen ist bisher noch unzureichend verstanden. In dieser Arbeit sollen die folgenden Punkte einen detaillierten Einblick in die Regulation des p53-Proteins geben:

1. Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen in verschiedenen subzellulären Kompartimenten mittels ESI-Massenspektrometrie
2. Untersuchung der subzelluläre Lokalisierung des Tumorsuppressors p53 und dessen in den proteomischen Analysen identifizierten Interaktionspartner Cyclophilin 18 (Cyp 18) in primären und von humanen Tumoren abgeleiteten Zellen mit unterschiedlichem p53-Status
3. Analyse posttranslationaler Modifikationen des p53-Proteins und der Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Cyp 18 mit Hilfe der Massenspektrometrie
4. *In vitro* Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion, unter Verwendung des Cyp 18-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) und einer Cyp 18-Mutante (Q62T) zur Charakterisierung der Bindung des p53 an das Cyp 18-Enzym
5. Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion in primären und von menschlichen Tumoren abgeleiteten Zellen mit unterschiedlichem p53-Status
6. Lokalisierung der Bindestelle der PPlase Cyp 18 innerhalb des p53-Proteins
7. Untersuchungen des Einflusses der Cyp 18-Interaktion auf p53-Funktionen, wie DNA-Bindung, Zellzykluskontrolle und Zielgenexpression

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Zelllinien

Humane Zellen / Zelllinien (p53-Status)

CCRF-CEM (mut-p53, R175H/R248Q)	- T-Zell-Leukämie
HL-60 (p53 ^{-/-})	- promyelozytische Leukämie
MCF-7 (Wt-p53)	- Brust-Adenokarzinom
NCI-H1299 (p53 ^{-/-})	- nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NCI-H1299/p53 ^{72P} (Wt-p53)	- nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (p53 ^{72P} stabil transf. Temperatur-sensitive Mutante A138V)
NCI-H1299/p53 ^{72R} (Wt-p53)	- nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (p53 ^{72R} stabil transf. Temperatur-sensitive Mutante A138V)
PBL (Wt-p53)	- periphere Blutlymphozyten gesunder Probanden

Murine Zelllinien

MEF (Wt-p53)	- murine embryonale Fibroblasten
--------------	----------------------------------

Die CCRF-CEM-, MCF-7- und HL-60-Zelllinien wurden vom DSMZ (Braunschweig, D) bezogen. Die NCI-H1299 und die stabil transfizierten Zelllinien NCI-H1299/p53^{72P} und NCI-H1299/p53^{72R} wurden von K. Sabapathy (Singapur) zur Verfügung gestellt. Die embryonalen Mausfibroblasten waren eine Gabe von B. Epe (Mainz). Die peripheren Blutlymphozyten wurden aus Blutproben zweier gesunder Probanden isoliert und ohne Kultivierung direkt analysiert.

2.1.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Cyclosporin A (CsA)	G. Fischer, MPI-Halle, D
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	c.c.pro-GmbH, Neustadt, D

Fötale Kälberserum (FCS)

SIGMA, Taufkirchen, D

Roswell's Park Memorial Institute (RPMI)

c.c.pro-GmbH, Neustadt, D

Trypsin

c.c.pro-GmbH, Neustadt, D

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper (Ursprung)	Antigen	MG	Anwendung	Firma
Ab-3 (Maus)	murines p53	53 kDa	IP	MERCK, Darmstadt, D
Ab 421 (Maus)	hp53 (AS 372-382)	53 kDa	WB, IP	FLI, Jena, D
Ab-7 (Schaf)	murines p53	53 kDa	WB	MERCK, Darmstadt, D
anti-Cyp 18 (Kaninchen)	Cyp 18	18 kDa	WB, IP, IF	G. Fischer, MPI-Halle, D
DO-1 (Maus)	hp53 (AS 22-25)	53 kDa	WB, IP, IF	FLI, Jena, D
biotinylierter DO-1 (Maus)	hp53 (AS 22-25)	53 kDa	WB	FLI, Jena, D
anti-IkB- α (Maus)	IkB- α	35-41 kDa	WB	Santa Cruz Biot., Heidelberg, D
anti-Mdm2 (Maus)	Mdm2	~90 kDa	WB	MERCK, Darmstadt, D
anti-p-p53 (Ser15) (Kaninchen)	phospho-p53 (Ser15)	53 kDa	WB	MERCK, Darmstadt, D
anti-Topo I (Maus)	DNA Topo- isomerase I	100 kDa	WB	BD Bioscience, Heidelberg, D

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Western Blot

anti-Maus IgG (H+L), HRP Konjugat

PROMEGA, Mannheim, D

anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP Konjugat

PROMEGA, Mannheim, D

anti-Schaf IgG (H+L), HRP Konjugat

MILLIPORE, Eschborn, D

Avidin-Peroxidase-Konjugat

MERCK, Darmstadt, D

Immunfluoreszenz

Cy TM 2-konjugierter anti-Maus IgG (H+L)	dianova, Hamburg, D
Cy TM 2-konjugierter anti-Kaninchen IgG (H+L)	dianova, Hamburg, D
Cy TM 3-konjugierter anti-Maus IgG (H+L)	dianova, Hamburg, D

2.1.3 Proteine/Peptide

GST p53 ¹⁻⁸¹ (Wt-p53, N-Terminus: AS 1-81)	Jena Bioscience, Jena, D
p53 ⁶⁸⁻⁸¹ -Peptid (Pro-reiche Domäne: AS 68-81/ 72P , Sequenz: ⁶⁸ EAAPPVAPAPAAPT ⁸¹)	D. Imhof, Uni-Jena, D
rek. p53 (Wt, Volllängenprotein)	FLI, Jena, D
rek. Cyp 18 (Wt)	G. Fischer, MPI-Halle, D
rek. Cyp 18/Q62T (Mutation im aktiven Zentrum)	G. Fischer, MPI-Halle, D

2.1.4 Enzyme/Inhibitoren/Marker

Aprotinin	PENTEX, Kankakee, USA
BenchMark TM Protein Ladder (10kDa-Marker)	Invitrogen, Karlsruhe, D
BenchMark TM Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
Benzonase	Merck, Darmstadt, D
Pefabloc	ROTH, Karlsruhe, D
Pepstatin A	SIGMA, Taufkirchen, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail	SIGMA, Taufkirchen, D
RNAse A (FACS)	Qiagen, Hilden, D
Sequencing Grade Modified Trypsin (MS-Analyse)	Promega, Madison, USA
Trypsin (Zellkultur)	SIGMA, Taufkirchen, D

2.1.5 Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/bis-Acrylamid (30% Lsg.)	ROTH, Karlsruhe, D
APS	SERVA, Heidelberg, D
Benzamidin	Fluka, Buchs, CH
Biodyne B Membran	PALL, Ann Arbor, USA
Blotpapier (Filterpapier)	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	SIGMA, Taufkirchen, D
Bradford-Reagenz	BIORAD, München, D

Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt, D
CHAPS	SIGMA, Taufkirchen, D
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare, München, D
Coomassie Brilliant Blue	SERVA, Heidelberg, D
DABCO	SIGMA, Taufkirchen, D
DAPI	SIGMA, Taufkirchen, D
DMSO	Fluka, Buchs, CH
EMSA“Gel-Shift Kit Nr.7193”	Panomix, Redwood City, USA
Glycin	SIGMA, Taufkirchen, D
Harnstoff	BIORAD, München, D
H ₂ O ₂	Fluka, Buchs, CH
IEF-Streifen	GE Healthcare, München, D
(Immobiline DryStrip, pH 3-10, 18 cm)	
IPG-Puffer	GE Healthcare, München, D
(Rehydratisierungspuffer, pH 3-10)	
Luminol	SIGMA, Taufkirchen, D
Magermilchpulver	MERCK, Darmstadt, D
Mineralöl	SIGMA, Taufkirchen, D
Natriumchlorid	SIGMA, Taufkirchen, D
4-Nitrophenylphosphat	SIGMA, Taufkirchen, D
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel, D
Objektträger (Teflon)	ROTH, Karlsruhe, D
OGP	SIGMA, Taufkirchen, D
Paraformaldehyd	SIGMA, Taufkirchen, D
para-Coumarsäure	SIGMA, Taufkirchen, D
Propidiumiodid	SIGMA, Taufkirchen, D
Protein A-Sepharose	GE Healthcare, München, D
PVDF-Blotmembran (Immobilon-P, Porengröße: 0.45 µm)	MILLIPORE, Eschborn, D
µRPC C ₁₈ -Säule	GE Healthcare, München, D
SDS	SIGMA, Taufkirchen, D
SYPRO [®] Ruby Blot Stain	BIORAD, München, D
TBP	SIGMA, Taufkirchen, D
TEMED	ROTH, Karlsruhe, D

Zorbax 300SB, 5 μ M, 5x0.3 mm Säule	Agilent Tech., Waldbronn, D
Zorbax 300SB, 5 μ M, 150x0.075 mm Säule	Agilent Tech., Waldbronn, D
TRISMA [®] Base	SIGMA, Taufkirchen, D
Triton [®] X-100	SERVA, Heidelberg, D
Tween20	SERVA, Heidelberg, D
UNICORN [™] Software	GE Healthcare, München, D
4-Vinylpyridin	SIGMA, Taufkirchen, D
Vivaspin-Konzentratoren	VIVASCIENCE, Hannover, D
ZipTip (C ₁₈ , RP)	MILLIPORE, Eschborn, D

Weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen SIGMA, ROTH, Fluka, MERCK, Greiner und Eppendorf bezogen.

2.1.6 Geräte

ÄKTA [™] FPLC [™]	GE Healthcare, München, D
Biometra (1D)	Whatman, Göttingen, D
CO ₂ Inkubator (SANYO)	MS-L GmbH, Wiesloch, D
EPICS XL MCL Fluss-Zytometer (FACS)	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ettan [™] Dalt six (2D)	GE Healthcare, München, D
Ettan micro LC [™] -HPLC (MS)	GE Healthcare, München, D
Finnigan LTQ Massenspektrometer (MS)	Thermo Electron, Oberhausen, D
Hoefer TE 77 (Blotgerät)	GE Healthcare, München, D
IMAGE STATION 2000 _R	Kodak, Rochester, US
IPGphor (2D)	GE Healthcare, München, D
Kleinschüttelgerät, Vortex Genie 2	Scientific Industr., Schwerte, D
Mikroprocessor pH Meter pH96	WTW, Weilheim, D
Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss, Jena, D
Photometer, Nicolet evolution 100	Thermo Electron, Oberhausen, D
Sonorex Super RK255H	Bandelin Electronic, Berlin, D
SpeedVac	Savant, Frankfurt, D
Storm 860-Scanner	GE Healthcare, München, D
Stratalinker 1800 (254nm)	Stratagene, Amsterdam, NL
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Generelle Zellkultur

Die humane adhärenz epitheliale Brustkrebszelllinie MCF-7 (Wt-p53) wurde mit RPMI-Medium, dem 10% FCS zugesetzt wurde, bei 5% CO₂ und 37°C im Inkubator kultiviert. Die promyelozytische Leukämie-Zelllinie HL-60 (p53^{-/-}) wurde mit DMEM, 20% FCS und 5% CO₂, bei 37°C kultiviert. Embryonale Mausfibroblasten (Wt-p53), die humane epitheliale nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie NCI-H1299, deren stabil-transfizierte Varianten NCI-H1299/p53^{72P} (Wt-p53) und NCI-H1299/p53^{72R} (Wt-p53) sowie die in Suspension wachsende humane T-Zell Leukämie-Zelllinie CCRF-CEM (mut-p53, R175H/R248Q) wurden in DMEM, versetzt mit 10% FCS, bei 10% CO₂ und 37°C, im Inkubator kultiviert. Vor der Zellernte wurden beide stabil transfizierten NCI-H1299-Varianten H1299/p53^{72P} und H1299/p53^{72R} zur Expression von Wt-p53 für zwei Stunden bei 32°C kultiviert (Siddique, 2006). Bei Erreichen von 70% Konfluenz wurden die Zellen dem Zelltyp entsprechend gesplittet, in nachfolgenden Versuchen weiterbehandelt oder geerntet. Für die Ernte beziehungsweise das Splitten der Zellen wurde das Medium von den adhärenz wachsenden Zellen abgenommen und der Zellrasen mit PBS/EDTA-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Zellrasens mit einer 1xTrypsin-Lösung. Nach dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche wurde frisches Medium zugesetzt und die Zellen, im Verhältnis abhängig vom Zelltyp, gesplittet beziehungsweise geerntet. Nach der Zellernte wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen.

<i>1xPBS-Puffer</i>	1.5 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ 140 mM NaCl 2.4 mM KCl
<i>PBS/EDTA-Puffer</i>	10 mM EDTA in 1xPBS
<i>1xTrypsin-Lösung</i>	10xTrypsinlösung mit 1xPBS verdünnt

2.2.1.2 Cyclosporin A-Behandlung der Zellen in Kultur

Dem jeweiligen Experiment entsprechend erfolgte die Supplementierung des Kulturmediums mit, wenn nicht anders ausgewiesen, 500 nM CsA, welches zuvor in Ethanol gelöst und sterilfiltriert wurde. Die Inkubationsdauer der Zellen mit dem CsA-supplementierten Medium entsprach 4 h.

2.2.1.3 UVC-Bestrahlung der Zellen in Kultur

Zur UVC-Behandlung wurden adhärent wachsende Zellen in Petrischalen kultiviert. Dem jeweiligen Versuchsansatz entsprechend wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 1xPBS gewaschen und eine geringe Menge 1xPBS zugesetzt, so dass der Zellrasen bedeckt war. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Zellen im Stratalinker bei 254 nm mit 25 J/m². Nach Zugabe des Kulturmediums erfolgte die Weiterkultivierung der Zellen für 4 h.

2.2.2 Immunfluoreszenz

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung spezieller Proteine können diese innerhalb der Zellen mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die Immunfluoreszenzexperimente wurden mit adhärent wachsenden MCF-7- und MEF-Zellen durchgeführt. Die jeweiligen Zelltypen wurden in Vertiefungen beschichteter Objektträger eingesät und bis zum Erreichen von ca. 70% Konfluenz im CO₂-Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal 1 min mit 1xPBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurden diese für 10 min bei 4°C in einer Lösung aus 4% PFA in 1xPBS-Puffer inkubiert, anschließend dreimal für 2 min mit 1xPBS-Puffer gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen für 2 min in einer Lösung aus 0.25% Triton X-100 in 1xPBS-Puffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen mittels einer Lösung aus 5% BSA in 1xPBS-Puffer über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS-Puffer wurde der primäre Antikörper in einer 1%igen BSA-Lösung 1:50 verdünnt auf die Zellen gegeben und eine Stunde in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Behandlung mit den jeweiligen Spezies-spezifischen fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS-Puffer, bei einer Verdünnung von 1:500, abgedunkelt für eine Stunde bei RT. Nachdem durch wiederholtes Waschen mit 1xPBS Reste des sekundären Antikörpers entfernt wurden, erfolgte das Anfärben der

DNA durch eine einminütige Inkubation der Zellen mit einer 0.5 µg/ml DAPI-Lösung. Die Versiegelung der Objektträger mittels Deckgläschen und Klarlack erfolgte nach Zugabe eines Tropfens Mounting-Puffer je Vertiefung.

DAPI-Stammlösung 1 mg/ml DAPI in 1xPBS

Mounting-Puffer 0.2 ml 1M Tris, pH 8
(für 10 ml) 223 mg DABCO
 9 ml Glycerol
 0.8 ml A.d.

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zu Analyse der spezifischen Verteilung der Zellzyklusphasen wurden die logarithmisch Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nach der Zellernte erfolgte die Fixierung der Zellen mit Hilfe von kaltem, absolutem Ethanol für eine Stunde bei 4°C. Vor der Analyse wurden die fixierten Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Die Anfärbung der DNA erfolgte anschließend durch Inkubation der Zellen mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbelösung für 30 min bei 37°C unter Lichtausschluss. Die Fluoreszenz des Propidiumiodids einzelner Zellen wurde mit Hilfe des EPICS XL-MCL Durchflusszytometers ermittelt. In jeder Messung wurden etwa 10000 Zellen analysiert.

PI-Färbelösung 250 µg/ml RNase A
 40 µg/ml PI
 in 1xPBS

2.2.4 Herstellung von zellulären Proteinextrakten

2.2.4.1 Herstellung von gesamtzellulären Proteinextrakten

Zur Minimierung des proteolytischen Abbaus wurde die komplette Prozedur des Zellaufschlusses auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer je 1×10^7 Zellen wurden diese mechanisch aufgeschlossen. Zur Spaltung der hochmolekularen Nukleinsäuren wurden dem Zellaufschluss 300 Einheiten Benzonase (DNase/RNase), welche zuvor mit 1 mM MgCl₂ versetzt wurde, zugesetzt. Das Homogenat wurde anschließend für 5 min auf Eis sonifiziert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und

15 sek Homogenisieren mittels eines Kleinschüttelgeräts, wurde die lösliche gesamtzelluläre Proteinfraction durch einen Zentrifugationsschritt bei 16000xg und 4°C für 30 min gewonnen. Es erfolgte die Entnahme einer Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.

<i>Lysispuffer</i>	25 mM Tris, pH 7.5
	150 mM NaCl
	0.5% OGP (w/v)
	0.2 mM PMSF
	2 µg/ml Pepstatin
	5 µg/ml Aprotinin
	5 µg/ml Leupeptin
	1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (v/v)

2.2.4.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakten

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurde dem Zellpellet 450 µl zytoplasmatischer Puffer zugesetzt und die Probe für 10 sek auf einem Kleinschüttelgerät homogenisiert. Nach 10 min Inkubation und 10 sek Homogenisierung auf dem Kleinschüttelgerät wurde die Probe bei 16000xg und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des zytosolischen Überstandes wurde das Pellet nochmals mit zytoplasmatischem Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Pellets in 250 µl nuklearem Puffer durch 15 sek Schütteln auf dem Kleinschüttelgerät. Nach Zugabe von 300 Einheiten Benzonase (DNase/RNase), welche zuvor mit 1 mM MgCl₂ versetzt wurde, erfolgte eine Sonifizierung des Homogenats für 5 min auf Eis. Es folgte ein Inkubationsschritt von 40 min, der nach jeweils 10 min durch wiederholtes Homogenisieren auf dem Kleinschüttelgerät unterbrochen wurde. Die lösliche nukleare Proteinfraction konnte durch 10 min Zentrifugation bei 16000xg und 4°C gewonnen werden. Die jeweiligen zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakte wurden nachfolgend mittels Vivaspin-Konzentratoren konzentriert und entsalzt. Die Proteinkonzentration der jeweiligen subzellulären Proteinfractionen wurde anschließend mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt.

<i>zytoplasmatischer Puffer</i>	10 mM HEPES/KOH, pH 7.9 1.5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0.5 mM DTT 0.2 mM PMSF 2 µg/ml Pepstatin 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (v/v)
<i>nukleärer Puffer</i>	20 mM HEPES-KOH, pH 7.9 25% Glyzerin (v/v) 420 mM NaCl 1.5 mM MgCl ₂ 0.2 mM EDTA 0.5 mM DTT 0.2 mM PMSF 2 µg/ml Pepstatin 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (v/v)

2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts der jeweiligen Proteinfractionen wurde der Bradford-Assay (Bradford, 1976) durchgeführt. Der quantitative Nachweis des Proteingehalts der Proteinlösungen erfolgte anhand von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit dem Farbstoff bildenden Bradford-Reagenz. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Das Bradford-Reagenz wurde zunächst 1:5 mit A.d. verdünnt. Zu 20 µl Proteinlösung wurde 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption der Proben bei 595 nm mit Hilfe eines UV-Spektrometers. Mit Hilfe einer Eichkurve von 0 bis 1000 µg/ml BSA, konnten die jeweiligen Konzentrationen der Proteinproben berechnet werden.

2.2.6 Immunaффinitäts-Chromatografie

Zur Untersuchung posttranslationaler Modifikationen des kernlokalisierten Wt-p53-Proteins wurden zunächst nukleare Proteinfractionen der MCF-7-Zellen hergestellt (Abschnitt 2.2.4.2). Das darin enthaltene p53-Protein wurde mit Hilfe der Methode der Immunaффinitätschromatographie, die auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen beruht, isoliert.

Zunächst erfolgte die Kopplung des Säulenmaterials, CNBr-aktivierte Sepharose, mit dem p53-spezifischen Antikörper 421 nach den Angaben des Herstellers. Die Immunaффinitätschromatografie erfolgte unter Verwendung der ÄKTA™FPLC™-Anlage, unter Steuerung durch die UNICORN™-Software, mit einem Fluss von 0.5 ml/min. Etwa 8.4 mg nuklearer Proteinextrakt von MCF-7-Zellen wurde in 10 ml Puffer A verdünnt auf die Säule gegeben. Der anschließende Waschvorgang der Säule erfolgte mit 15 ml Puffer A. Anschließend wurde das gebundene p53-Protein durch 20 ml des Elutionspuffer B wieder von der AK-Säule abgelöst. Die p53-haltigen Eluatfraktionen (je 1 ml) wurden vereinigt, mit Tris-Puffer (pH 9) neutralisiert und mit Hilfe von Vivaspin-Konzentratoren auf etwa 40 µl konzentriert. Das isolierte p53-Protein wurde anschließend massenspektrometrisch hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen analysiert (Abschnitte: 2.2.9, 2.2.10, 2.2.14 und 2.2.15).

<i>Puffer A</i>	20 mM HEPES/KOH, pH 7.4
	500 mM NaCl
	0.05 % Tween20 (v/v)

<i>Elutionspuffer B</i>	100 mM Glycin, pH 2.7
-------------------------	-----------------------

2.2.7 Band-Shift-Analyse (EMSA)

Zur Analyse des Bindeverhaltens von p53 an dessen Konsensus-DNA-Sequenz unter Einfluss der Bindung weiterer Proteine wurden Band-Shift-Experimente durchgeführt. Hierzu kam der "Gel-Shift Kit Nr. 7193", der eine biotinylierte DNA-Probe mit der p53-Konsensus-Sequenz (5'TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGG GG-3') des humanen *GADD45*-Promotors enthielt, zum Einsatz. Die Experimente wurden unter Verwendung von rek. p53 nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der p53-spezifische Antikörper DO-1, Cyclophilin 18 und eine

Cyclophilin 18-Mutante (Q62T) wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die p53-DNA Bindeaktivität untersucht.

2.2.8 Co-Immunopräzipitation

Zur Untersuchung von p53-Protein-Interaktionen wurde die Methode der Co-Immunopräzipitation angewandt. Die CoIP-Experimente wurden mit den jeweils im Ergebnisteil beschriebenen zellulären Proteinfractionen durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, erfolgte zunächst eine Inkubation von 400 µg zellulären Proteinextrakts (Abschnitt 2.2.4) mit 50 µl Protein A-Sepharose, welche zuvor in IP-Puffer äquilibriert wurde, für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Anschließend wurde der Überstand mit Protein A-Sepharose vermischt, welche zuvor mit 25 µg des jeweils angegebenen Antikörpers konjugiert wurde und für 2 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Zur Analyse von Proteininteraktionen unter definierten Konditionen wurden die jeweils im Ergebnisteil beschriebenen rekombinant exprimierten Proteine, beziehungsweise Peptide, in ausgewählten Konzentrationen gemischt und der CoIP-Prozedur zugeführt. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose dreimal mit 1 ml eiskaltem IP-Puffer gewaschen, um ungebundenes Protein abzutrennen. Die Proteinkomplexe wurden somit isoliert und nachfolgend bei 95°C für 5 min in Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) denaturiert.

<i>IP-Puffer</i>	20 mM HEPES/KOH, pH 7.4
	500 mM NaCl
	0.05% Tween20 (v/v)

<i>Laemmli-Probenpuffer</i>	10% SDS (w/v)
	25% Glyzerin (v/v)
	25% Mercaptoethanol (v/v)
	Bromphenolblau (Spur)

2.2.9 SDS-PAGE (1D)

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung komplexer Proteingemische nach dem Molekulargewicht der in der Probe enthaltenen Proteine. Zur Anwendung kamen, wenn nicht anders ausgewiesen, 12,5%ige SDS-Gele. Zum Nachweis von Proteinen im Zellaufschluss mit Hilfe des

Immunoblot-Verfahrens wurden, wenn nicht anders geschrieben, 60 µg Protein je Gelbahn aufgetragen. Die Proteinproben wurden mit je $\frac{1}{5}$ Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Verwendet wurde das 1970 von Laemmli entwickelte Puffersystem (Laemmli, 1970). Der Elektrophoreselauf erfolgte in einer Biometra-Apparatur bei 25 mA/Gel für 1 h.

Sammelgel

Acrylamid-Lsg. (29:1)	Sammelgelpuffer	Aqua dest.	10% APS (w/v)	TEMED
2.5 ml	1.5 ml	1.938 ml	60 µl	2.5 µl

Trenngel

Acrylamid-Lsg. (29:1)	Trenngelpuffer	Aqua dest.	10% APS (w/v)	TEMED
413 µl	625 µl	1.463 ml	12.5 µl	2.5 µl

Sammelgelpuffer 0.5 M Tris, pH 6.8
 10% SDS (w/v)

Trenngelpuffer 1.5 M Tris, pH 8.8
 10% SDS (w/v)

Laufpuffer 25 mM Tris
 92 mM Glycin
 0.1% SDS (w/v)

2.2.10 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur Visualisierung der Proteinspots und -banden erfolgte das Anfärben der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blue direkt im Gel. Das Gel wurde 1 h in der Färbelösung geschwenkt. Die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs erfolgte anschließend durch einstündiges Schwenken in der Entfärbelösung.

Färbelösung 0.027% Coomassie-Brilliant-Blue (w/v)
 6.3% Essigsäure (v/v)
 45% Methanol (v/v)

Entfärbelösung 3.4% Essigsäure (v/v)
 5% Methanol (v/v)

2.2.11 Immunodetektion mittels Western-Blot

2.2.11.1 Semidry-Western-Blot

Mit Hilfe der Methode des Semidry-Western-Blot (Kyhse-Andersen, 1984) wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 2.2.9) aus der SDS-Polyacrylamidmatrix über Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen und somit für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Das Proteinblotting erweitert die Nachweismöglichkeiten der elektrophoretisch getrennten Proteine, da die auf der Membranoberfläche adsorbierten Proteine für großmolekulare Liganden, z.B. Antikörper, frei zugänglich sind. Zur Vorbehandlung der PVDF-Membran wurde diese zur Benetzung der hydrophoben Oberfläche 1 min in Methanol geschwenkt, 2 min in A.d. gespült und anschließend 2 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulosemembran wurde ausschließlich für 2 min in Blotpuffer äquilibriert. Der Blotvorgang erfolgte für 1 h bei 200 mA.

<i>Transferpuffer</i>	10% Methanol (v/v)
	96 mM Glycin
	10 mM Tris base

2.2.11.2 Fluoreszenzfärbung der Proteine

Der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO[®] Ruby Blot Stain färbt auf der PVDF-Membran adsorbierte Proteine mit einer unteren Empfindlichkeitsgrenze von 2-8 ng Protein pro Bande an. Die Membran wurde zuerst für 15 min in einer Lösung aus 7% Essigsäure und 10% Methanol geschwenkt, anschließend viermal für 5 min mit A.d. gewaschen und nachfolgend 15 min mit der SYPRO[®] Ruby Färbelösung inkubiert. Der ungebundene Farbstoff wurde anschließend durch dreimal 1 min Waschen mit A.d. entfernt. Im Anschluss daran erfolgte die Detektierung der Proteinfluoreszenz mit dem Storm 860-Scanner. Das Emissionsmaximum des Farbstoffs liegt bei etwa 618 nm (Anregungswellenlängen 280 nm und 450 nm).

2.2.11.3 Immunologische Detektierung

Proteine lassen sich nach der Immobilisierung auf der PVDF-Membran mit Hilfe von Antikörpern detektieren. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran zunächst mit einer Blockierungslösung für 1 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Des Weiteren erfolgte die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper in der Antikörperverdünnungslösung für 1 h bei RT. Nach dreimal wiederholtem Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 min, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in Antikörperverdünnungslösung für eine Stunde bei RT. Nach dreimal 10 min Waschen mit TBS-T-Puffer wurde der Blot entwickelt, wobei man die enzymatische Aktivität der an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase nutzt und damit die Position des jeweiligen Antigens auf der Membran sichtbar macht. Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden 1:1 gemischt und die Membran für 1 min darin inkubiert. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit Chemilumineszenz aus. Dabei handelt es sich um die sogenannte ECL-Reaktion. Das dabei entstandene Licht wurde mit der IMAGE STATION 2000_R gemessen.

<i>TBS-T- Puffer</i>	20 mM Tris, pH 7.5 500 mM NaCl 0.1% Tween20 (v/v)
<i>Blockierungslösung</i>	5% Magermilch (w/v) 0.1% Tween20 (v/v) in TBS-T
<i>AK-Verdünnungslösung</i>	5% Magermilch (w/v) 0.1% Tween20 (v/v) in TBS-T
<i>ECL-Lösung 1</i>	100 mM Tris/HCl, pH 8.5 2.5 mM Luminol 400 µM Paracumarsäure
<i>ECL-Lösung 2</i>	100 mM Tris/HCl, pH 8.5 5.4 mM H ₂ O ₂ (v/v)

2.2.12 Far-Western-Analyse

Zur *in vitro*-Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion wurde die Methode des Far-Western durchgeführt. Das p53-enhaltende SDS-Gel (siehe Abschnitt 2.2.9) wurde für 1 h bei RT in Renaturierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Übertragung der

Proteine, bzw. Peptide, mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (siehe Abschnitt 2.2.9.1). Des Weiteren wurde die Methode des Far-Western auch durch direktes Auftropfen der p53-haltigen Lösung auf eine Nitrozellulosemembran durchgeführt. Freie Bindestellen auf der Membran wurden durch eine Inkubation in der Blockierungslösung für 1 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 1xCMF/PBS-Tween20 [0.05% (v/v)] wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Cyp 18-haltigen 1xCMF/PBS-Lösung geschwenkt. Die eingesetzten Cyp 18-Konzentrationen sind im jeweiligen Experiment im Ergebnisteil angezeigt. Nach dreimal 10 min Waschen erfolgte die Immun-detektion des gebundenen Interaktionspartners (Cyp 18) nach Abschnitt 2.2.11.3.

<i>Renaturierungspuffer</i>	50 mM Tris/HCl, pH 7.5 20% Glycerin (v/v)
<i>1xCMF/PBS, pH 7.5</i>	167 mM NaCl 255 μ M Na ₂ HPO ₄ 1.95 mM KH ₂ PO ₄
<i>Blockierungslösung</i>	5% Magermilch (w/v) 0.05% Tween20 (v/v) in 1xCMF/PBS
<i>Probenladepuffer (für FW)</i>	2.5 mM Tris/HCl, pH 8.0 10% Glycerin (v/v) 2.5% SDS (w/v) 100 mM DTT 0.05% Bromphenolblau (w/v)

2.2.13 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)

Zur Analyse komplexer Proteingemische, beispielsweise fraktionierte Zelllysate, wurde die hochauflösende Methode der zweidimensionalen Elektrophorese (O'Farrel, 1975 und Klose, 1975) verwendet. Die zweidimensionale Gelelektrophorese trennt Proteine nach zwei unabhängigen Kriterien, dem isoelektrischem Punkt und dem Molekulargewicht, in zwei Dimensionen auf.

2.2.13.1 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten. Sie trennt Proteine aufgrund ihrer verschiedenen isoelektrischen Punkte. Ein stabiler und kontinuierlicher pH-Gradient, mit gleichmäßiger und konstanter Leitfähigkeit sowie Pufferkapazität, ist Grundbedingung zur Erzielung hochauflösender und reproduzierbarer Trennergebnisse. Es wurde ein immobilisierter pH-Gradient (Görg, 1985) verwendet. Je IEF-Streifen (pH 3-10, 18 cm) wurden 300 µg Protein (in 50 µl) der zu fokussierenden Protein-Probe mit 310 µl Rehydatisierungspuffer (RH-Gebrauchslösung) versetzt. 350 µl der vorbereiteten Probenlösung wurden in eine Keramikküvette pipettiert, der trockene IEF-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Oberfläche der Probenlösung platziert und anschließend mit 1 ml Mineralöl überschichtet. Die Isoelektrische Fokussierung wurde mit dem IPGphor-Gerät unter Beachtung der IEF-Parameter nach IEF-Protokoll durchgeführt. Der erste Schritt des IEF-Protokolls diente zur *in-gel*-Rehydrierung der IEF-Streifen. Die nachfolgenden Schritte 2-7 beinhalten die Isoelektrische Fokussierung. Zwischen den jeweiligen Schritten 1-5 wurde die Spannung stufenweise erhöht. Von Schritt 5 zu Schritt 6 erfolgte die Erhöhung der Spannung mittels eines Gradienten. Der Lauf der Isoelektrischen Fokussierung wurde nach 92000 Vh – 95000 Vh beendet.

<i>IEF-Parameter</i>	20°C, 50 µA/Streifen
<i>IEF-Protokoll</i>	Schritt 1: 50 V, 10 h Schritt 2: 100 V, 1h Schritt 3: 300 V, 1h Schritt 4: 500 V, 1h Schritt 5: 1000 V, 1h Schritt 6: 8000 V, 4 h Schritt 7: 8000 V, 12 h
<i>RH-Puffer-Stammlösung</i>	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 0.5% CHAPS (w/v) 1.5% OGP (w/v)

RH-Puffer-Gebrauchslsg. 2.5 mM TBP
 20.5 mM 4-VP
 2% IPG-Puffer (v/v)
 in RH-Stammlösung

2.2.13.2 SDS-PAGE (2D)

Um einen optimalen Proteintransfer von der ersten zur zweiten Dimension zu erzielen, wurden die IEF-Gelstreifen aus der ersten Dimension zunächst für 20 min bei RT in 15 ml SDS-Äquilibriumspuffer inkubiert. Die Proteine wurden mit SDS beladen und nochmals reduziert. Nachfolgend wurden die Streifen kurz mit Elektrophoresepuffer gespült und anschließend vorsichtig auf die Oberfläche eines 12,5% SDS-Gels der Größe 25.5 cm x 21 cm aufgelegt. Weiterhin wurden jeweils an der basischen und sauren Seite des Streifens je 8 µl 10 kDa-Marker auf Filterblättchen positioniert. Abschließend erfolgte die Fixierung des IEF-Streifens auf der Oberfläche des SDS-Gels mit 0,5% Agarose, die zuvor auf 50°C temperiert wurde. Das so präparierte SDS-Gel wurde in die Ettan™ Dalt six Elektrophorese-Einheit positioniert. Der Elektrophoresepuffer im oberen Tank war im Gegensatz zum unteren doppelt konzentriert. Die Apparatur wurde mit 10 mA je Gel ca. 17 h betrieben.

SDS-Äquilibriumspuffer

Stammlösung 6 M Harnstoff
 30% Glycerol (v/v)
 2% SDS (w/v)

Gebrauchslösung 5 mM TBP
 50 mM Tris, pH 8.8
 in Stammlösung

Trenngel (12.5%)

Acrylamid-Lsg. (29:1)	1.5M Tris, pH 8.8	Aqua dest.	10% APS (w/v)	TEMED
36 ml	21.4 ml	28.1 ml	12.5 µl	2.5 µl

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0.1% SDS (w/v)

2.2.14 Protease-Verdau von Proteinbanden und Proteinspots

Um Peptide zur massenspektrometrischen Analyse zu erhalten, erfolgte eine enzymatische Spaltung der denaturierten Proteine aus den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen mit einer selektiven Protease, dem Trypsin. Die Protease Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen nach zwei basischen Aminosäuren, Lysin und Arginin, und generiert so ein für das jeweilige Protein typisches Peptidgemisch. Das pH-Optimum des Trypsins liegt bei pH 8-9.

Zunächst wurden ausgewählte Proteinspots beziehungsweise -banden aus den Coomassie-gefärbten 1D- bzw. 2D-Gelen (siehe Abschnitte 2.2.9 und 2.2.13) ausgeschnitten und zerkleinert. Es folgte das Dehydrieren und Entfärben der die jeweiligen Proteine enthaltenden Gelstücke durch Zugabe von 300 µl 5 mM NH_4HCO_3 , pH 8.3 und 20 min Schütteln bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Prozedur dreimal wiederholt. Danach wurden die Proben mit je 300 µl Acetonitril versetzt, 10 min bei RT geschüttelt und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden die Proben 1 h in der SpeedVac getrocknet. Zur Aufspaltung der in den Proteinen vorhandenen Disulfid-Brücken erfolgte anschließend eine Behandlung mit 100 µl TBP/4-VP-Lösung. Die Proben wurden nach Zugabe der Lösung 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Proben mit je 300 µl 5 mM NH_4HCO_3 , pH 8.3 versetzt, bei RT geschüttelt und der Überstand anschließend verworfen. Die Prozedur wurde viermal wiederholt. Danach wurden 300 µl Acetonitril zugegeben und die Probe für 10 min bei RT geschüttelt. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte ein Trockenschritt in der SpeedVac für 1 h. Danach wurden 30 µl Trypsinlösung hinzu gegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Nachdem der Überschuss an Trypsinlösung entfernt wurde, erfolgte ein Übersichten der Proben mit 60 µl 5 mM NH_4HCO_3 , pH 8.3. Die Proben wurden nachfolgend für mindestens 16 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben mit je 60 µl 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8.3 versetzt und 10 min bei RT geschüttelt. Die Überstände der Proben wurden abgenommen und mit den vorherigen Überständen aufbewahrt. Die Extraktion der Peptide erfolgte mittels einer Lösung aus 50% Acetonitril (v/v) und 5% TFA (v/v). Die Probe wurden mit je 60 µl dieser Lösung versetzt und 10 min bei RT geschüttelt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt (modifiziert nach Shevchenko, 1996).

Die mittels SpeedVac lyophilisierten Proben, die die tryptischen Peptide enthalten, wurden in 0.1% TFA gelöst und mit Hilfe von ZipTips entsalzt. Die ZipTips wurden zuvor mit 50% Acetonitril (v/v) befeuchtet und anschließend mit 0.1% TFA (v/v) äquilibriert. Danach wurden die Peptide aus den entsprechenden Lösungen durch Pipettieren am Gelmaterial der ZipTips immobilisiert. Es folgten ein Waschschriff mit 0.1% TFA-Lösung (v/v) und die anschließende Elution der nun salzfreien Peptide mit TA-Lösung.

<i>TBP/4-VP-Lösung</i>	0.1 mM TBP 0.82 mM 4-VP
<i>Trypsinlösung</i>	12,5 µg/ml Trypsin
<i>TA-Lösung</i>	50% Acetonitril (v/v) 0.1% Trifluoressigsäure (v/v) (2:1)

2.2.15 Massenspektrometrische Analyse (LC-ESI-MS)

Die aus dem tryptischen *in-gel*-Proteinverdau resultierenden Peptide wurden nachfolgend massenspektrometrisch analysiert. Die LC-ESI-MS-Anlage besteht aus einer Ettan micro LCTM-HPLC, welche an ein Finnigan LTQ Massenspektrometer gekoppelt ist. Die HPLC wurde mit einer Zorbax 300SB, 5 µM, 5x0.3 mm Trap-Säule und einer Zorbax 300SB, 5 µM, 150x0.075 mm Separations-Säule betrieben. Die Separierung der Peptide mittels HPLC erfolgte durch einen linearen Gradient von 0% bis 47% Acetonitril, gefolgt von einer schrittweisen Elution der Peptide mit 84% Acetonitril in 0.1% Ameisensäure. Der Lauf wurde durch die UnicornTM Software von GE Healthcare überwacht. Das LTQ-MS-Gerät lief unter der Kontrolle der Xcalibur 1.4TM Software von Thermo Scientific. Die Prozessierung der MS/MS-Produktions-Spektren und die finale Proteinidentifikation erfolgte mittels der BioWorks 3.2TM Software von Thermo Scientific und der NCBI Human-Protein Datenbank.

3 Ergebnisse

3.1 Proteomischer Ansatz zur Identifizierung von p53-Interaktionspartnern

Biologische Prozesse werden über dynamische Signalnetzwerke von miteinander interagierenden Proteinen reguliert, die chemische oder physikalische Stimuli zu spezifischen Effektor-Molekülen weiterleiten. Grundlegende zelluläre Funktionen, wie beispielsweise die DNA-Replikation, die Transkription und die DNA-Reparatur, erfordern ein koordiniertes Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen, die in Multiprotein-Komplexen mit individueller Zusammensetzung und Struktur assembliert sind. Die Analyse von Proteinkomplexen, Protein-Interaktions-Netzwerken und deren dynamischen Verhalten, als einer Funktion von Zeit und zellulärem Zustand, sind von großem Interesse in der biologischen Forschung (Gingras, 2007).

Die biochemische Aktivität des p53 als Transkriptionsfaktor wird durch eine Vielzahl von Partnerproteinen reguliert, welche die Stabilität, die subzelluläre Lokalisierung, posttranslationale Modifikationen und die Interaktionen mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie beeinflussen (Prives, 1999). Um die funktionelle Aktivität des p53-Proteins zu regulieren, ist somit eine aufeinander abgestimmte Zusammenarbeit einer großen Zahl von Proteinen notwendig. Die Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen ist daher von grundlegendem Interesse auf dem Weg zum Verständnis der komplexen Regulation dieses multifunktionellen Proteins.

3.1.1 Subzelluläre Lokalisierung des Tumorsuppressorproteins p53 in verschiedenen humanen Tumorzelllinien

Die adäquate subzelluläre Lokalisation ist entscheidend für die Regulation der p53-Funktion. In murinen Balb/c 3T3-Zellen wurde gezeigt, dass endogenes p53 seine subzelluläre Verteilung rapide ändert. Während des Zellzyklus befindet sich p53 die meiste Zeit im Zytoplasma und kommt im Kern ausschließlich in einer kurzen Zeit maximaler DNA-Synthese vor (Shaulski, 1990). Das p53-Protein fungiert als nuklearer Transkriptionsfaktor, weist aber zusätzlich Funktionen im Zytoplasma auf, wie beispielsweise die Einleitung der Apoptose und die Inhibierung der Autophagie (Green, 2009).

Das Ziel initialer Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die Analyse der subzellulären Lokalisierung des p53-Proteins und die anschließende Detektierung von p53-Protein-Interaktionen in den jeweiligen Zellkompartimenten. Zunächst erfolgte eine Validierung der angewandten Zellfraktionierungstechnik. Dazu wurden spezifische Marker-Proteine in den jeweiligen subzellulären Proteinfractionen nachgewiesen (Abbildung 3.1). Als Marker für die nukleare Proteinfraction wurde die humane Topoisomerase I (Topo I) eingesetzt, die positive Superspiralisierungen der DNA entspannt, die bei Vorgängen der Replikation und Transkription entstehen (Champoux, 2001). Beim Inhibitor von kappa B (IκB) handelt es sich um ein typisch zytoplasmatisches Protein, dessen Funktion in der Bindung der NLS des NF-κB und dessen zytoplasmatischer Sequestrierung und somit Inaktivierung liegt (Karin, 2000).

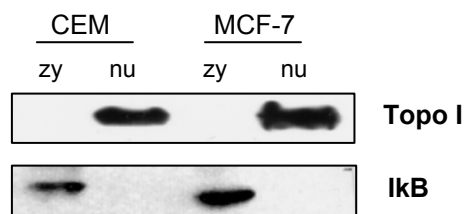


Abbildung 3.1: Nachweis von zytoplasmatischen und nuklearen Markerproteinen

Der Immunoblot zeigt den Nachweis von Topoisomerase I (Topo I) und des Inhibitors von NF-κB (IκB) in zytoplasmatischen (zy) und nuklearen Proteinextrakten (nu) von CEM- und MCF-7-Zellen.

Beide Marker-Proteine wurden mittels Immunoblot-Verfahren ausschließlich in den jeweiligen subzellulären Proteinfractionen nachgewiesen. Somit konnte die hier angewandte Zellfraktionierungstechnik generell validiert werden.

Zur Analyse von p53/Protein-Interaktionen unter stressfreien Bedingungen wurden MCF-7-Zellen (humanes Brust-Adenokarzinom), die p53 in der Wt-Variante und CEM-Zellen (humane T-Zell-Leukämie), die mutiertes p53 (R175H/R248Q) enthalten, zunächst hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung des p53-Proteins untersucht (Abbildung 3.2 A). Die p53-negative humane promyelozytische Leukämie-Zelllinie HL-60 kam in den nachfolgenden CoIP-Experimenten als Negativkontrolle zum Einsatz. Zur Validierung der Ergebnisse der Immunoblot-Analysen wurden Immunfluoreszenz-Experimente mit den adhärent wachsenden MCF-7-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.2 B).

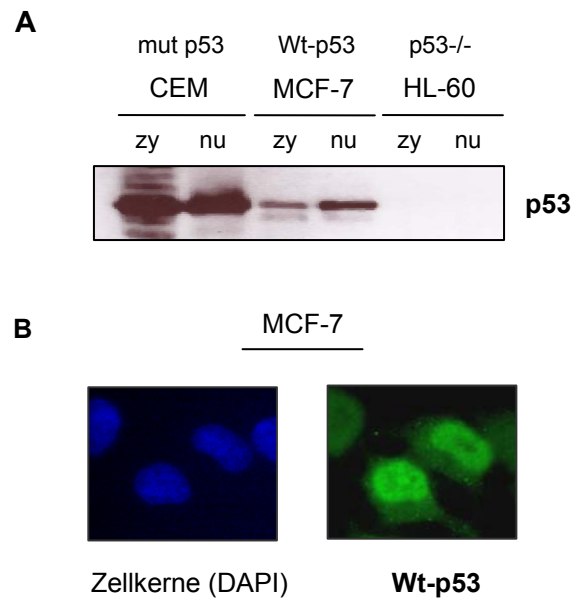


Abbildung 3.2: Subzelluläre Lokalisierung des p53-Proteins in CEM- und MCF-7-Zellen

A: Die Detektion der verschiedenen p53-Varianten erfolgte in zytoplasmatischen (zy) und nuklearen Proteinfraction (nu) von MCF-7- (Wt-p53), CEM- (mut-p53, R175H/R248Q) und HL-60-Zellen (p53-/-) mittels Immunoblot. **B:** Die Lokalisierung des Wt-p53 in MCF-7-Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz.

Sowohl Wt-p53 als auch die mutierte p53-Variante R175H/R248Q wurden sowohl in den nuklearen als auch in den zytoplasmatischen Proteinfractionen beider Zelllinien mittels Immunoblot nachgewiesen. Die Wt-p53-Variante war in den MCF-7-Zellen geringer exprimiert als die mutierte p53-Variante in den CEM Zellen. Die überwiegend nukleare Lokalisierung des Wt-p53 in den MCF-7-Zellen konnte zusätzlich durch Immunfluoreszenzexperimente bestätigt werden.

3.1.2 MS-basierte Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen aus zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfractionen

Zelluläre Proteine, die mit p53 interagieren, spielen sowohl in der positiven als auch in der negativen Regulation des Tumorsuppressors eine entscheidende Rolle und modulieren dessen Antwort auf spezifische zelluläre Stress-Signale. Auf Massenspektrometrie basierte Analysen der p53/Protein-Interaktionen sind unerlässlich zum Verständnis der Regulation der p53-Funktionen.

Ziel der folgenden Untersuchungen war die proteomische Analyse von p53-interagierenden Proteinen in zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfractionen verschiedener Zelllinien (Abbildung 3.3).

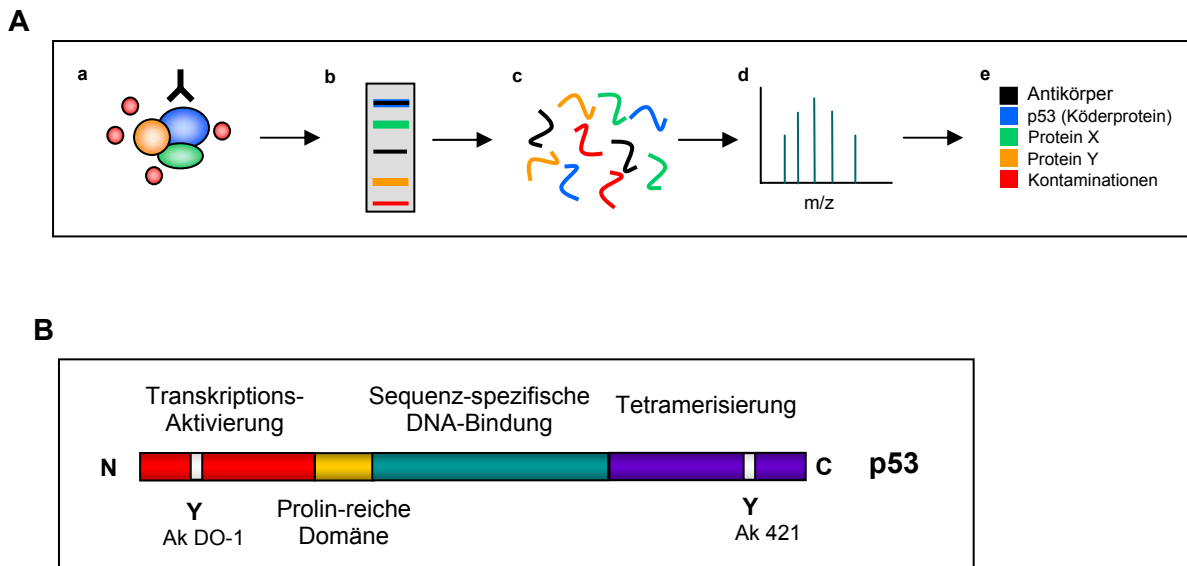
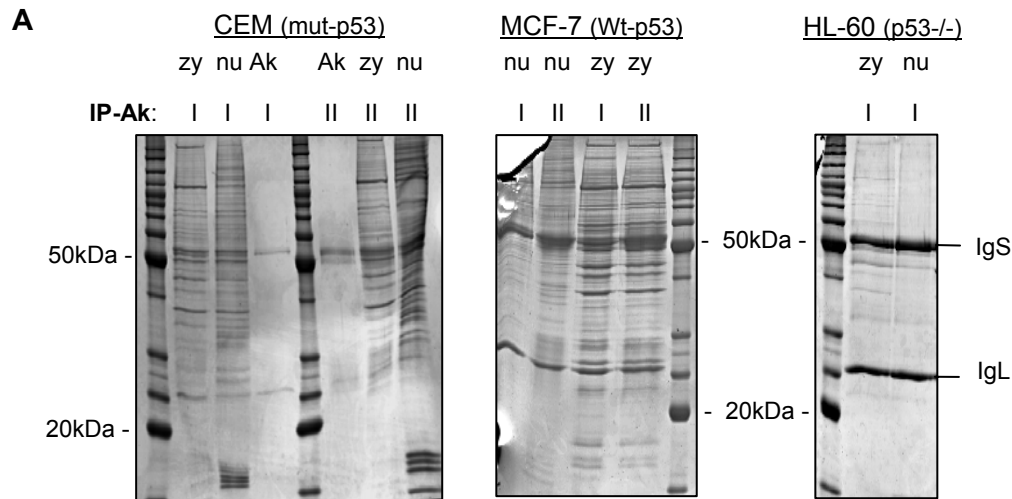


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf der Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen

A: Schematische Darstellung des Ablaufs der MS-basierten Identifizierung von p53-Interaktionspartnern: a) CoIP von subzellulären Proteinfractionen mit anti-p53 Ak, b) Coomassie-gefärbtes SDS-Proteingel mit aufgetrennten CoIP-Proben, c) aus dem tryptischen *in-gel*-Proteinverdau resultierende Peptide, d) massenspektrometrische Analyse der Peptide, e) Computer-gestützte Proteinidentifizierung. **B:** Schematische Darstellung des p53-Proteins (393 AS) mit den funktionellen Proteindomänen und Erkennungsstellen für die in der CoIP verwendeten anti-p53 Antikörper (Y). Der Antikörper DO-1 erkennt die AS 20-25 und der Antikörper 421 erkennt die AS 372-382 des p53-Proteins.

Zur Untersuchung der Interaktion von Wt-p53 und einer p53-Variante, mit zwei Mutationen in der DNA-Bindedomäne (R175H/R248Q), mit zellulären Proteinen wurden die p53/Protein-Komplexe der jeweiligen zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfractionen von MCF-7- und CEM-Zellen durch CoIP mit p53-spezifischen Antikörpern isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Um eine möglichst optimale Abdeckung der Interaktionspartner über das gesamte p53-Protein zu erreichen, kamen sowohl der Ak DO-1, der die AS 20-25 im N-Terminus des p53-Proteins erkennt, als auch der Ak 421, der die AS 372-382 im p53-C-Terminus erkennt, in den CoIP-Experimenten zum Einsatz. Die Proteinbanden des p53 und der jeweiligen p53-Interaktionspartner wurden aus den Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten (Abbildung 3.4 A), tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide mit Hilfe der nLC-ESI-Massenspektrometrie analysiert.

**B**

p53-Interaktionspartner	Wt-p53	mut-p53	zy	nu	potentielle Funktionen
Mdm2	x		x		p53-Protein-Abbau
Proteasom UE alpha	x		x		
Importin-β1	x		x		Protein-Transport
Exportin-1	x		x		
Dynein/Tubulin	x	x	x		Anbindung an zelluläre Matrix
Aktin	x	x	x	x	
Nesprin-2		x		x	
LaminB		x		x	
Matrin3		x		x	DNA-Replikation/Reparatur
Werner Syndrom Protein		x		x	
RPA (p70)		x		x	
NDH11 (Ku86)		x		x	
MCM3, 4, 6, 7		x	x	x	
Cdt1	x		x		
Topoisomerase I	x	x		x	
HMGB2		x	x	x	Phosphorylierung
PARP1	x			x	
PCNA		x		x	
DNA-PKcs		x		x	
Cdc2-rel. PK		x		x	Mitotischer Checkpunkt/ Spindelassemblierung
p38 MAPK 13		x	x		
CENPF		x		x	
BUB-Kinase		x	x		
Ki-67	x	x	x	x	

C

	Proteinname	Uniprot acc. Nr.	MG (kDa)
1	Cyclophilin 18	P62937	17.9
2	Cyclophilin 23	P23284	22.7
3	endoplasmic reticulum Protein ERp29	P30040	29.0
4	FK506-binding protein 3	Q00688	25.2
5	Hitzeschockprotein 70 kDa	P11142	70.8
7	Hitzeschockprotein 27 kDa beta	P04792	22.8
8	Hitzeschockprotein 60 kDa	P10809	61.1
9	Hitzeschockprotein HSP90-alpha	P07900	84.6
10	Hitzeschockprotein HSP90-beta	P08238	83.1
12	Prefoldin Untereinheit 1	O60925	14.2
13	Protein Disulfid-Isomerase	P07237	57.1
14	UDP-Glukose Ceramid Glykosyltransferase	Q9NYU2	175.0

D

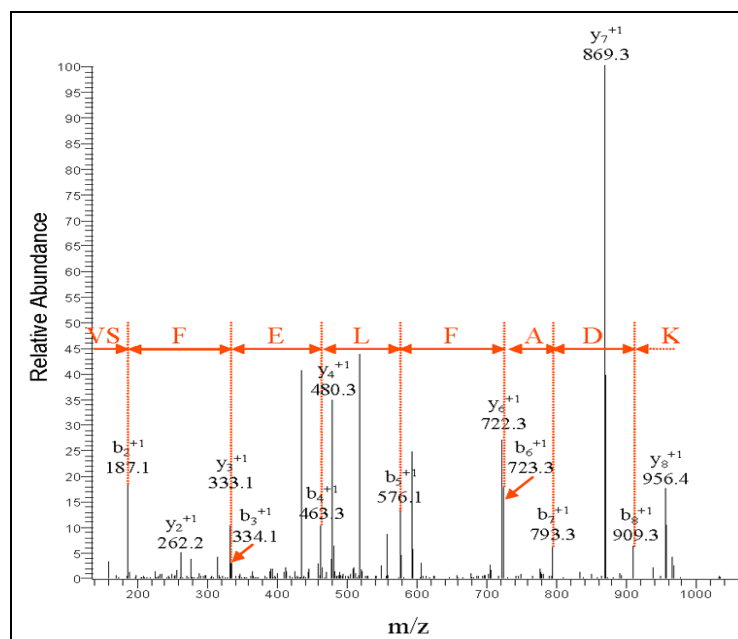


Abbildung 3.4: Proteomische Studien zur Identifizierung von p53-Interaktionspartnern mittels ESI-Massenspektrometrie

A: p53/Protein-Komplexe wurden mittels CoIP, unter Verwendung von p53-spezifischen Antikörpern DO-1 (I) und 421 (II), aus zytoplasmatischen (zy) und nuklearen (nu) Proteinfractionen von MCF-7- (Wt-p53), CEM-(mut-p53/R175H,R248Q) und HL-60-Zellen (p53^{-/-}, Negativkontrolle) isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden, die p53-Interaktionspartner enthalten, aus den Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch analysiert. **B:** Tabellarische Darstellung der Interaktionspartner des Wildtyp (Wt) und mutierten (mut) p53 im Zytoplasma (zy) und Zellkern (nu), identifiziert durch ESI-MS Analyse. **C:** In der Tabelle sind molekulare Chaperone aufgelistet, die als potentielle Interaktionspartner des p53 identifiziert wurden. Dargestellt sind der Proteinname, die Accession-Nummer bei Uniprot (www.uniprot.org) und das Molekulargewicht in Kilodalton [MG (kDa)] des jeweiligen Proteins. **D:** MS-Analyse: MS/MS-Spektrum des Cyp 18-Peptides VSFELFADK, welches im tryptischen Verdau einer Cyp 18-Gelbande identifiziert wurde. Dargestellt sind die acht detektierten Ionen. Aufgetragen ist die relative Abundanz über dem Verhältnis Masse zu Ladungszahl (m/z).

In den MS-basierten Interaktionsstudien erfolgte die Identifizierung einer Vielzahl von Proteinen, die mit dem p53-Protein in den jeweilig analysierten subzellulären Kompartimenten interagieren (Abbildung 3.4 B). Dazu gehören Proteine, die bei der Stabilisierung, dem Proteintransport und -abbau innerhalb der Zelle beteiligt sind. Weiterhin wurden Proteine der DNA-Replikation und DNA-Reparatur, der zellulären Matrix, des mitotischen Kontrollpunkts, der Spindel-Zusammenlagerung und verschiedene Kinasen identifiziert. Einige dieser Proteine wurden bereits in der

Literatur als Interaktionspartner des p53 beschrieben, weitere sind bisher noch unbekannt. Weiterhin wurde eine Gruppe von Proteinen, die als Faltungshelfer für Proteine in der Zelle fungieren, als p53-Interaktionspartner identifiziert (Abbildung 3.4 C).

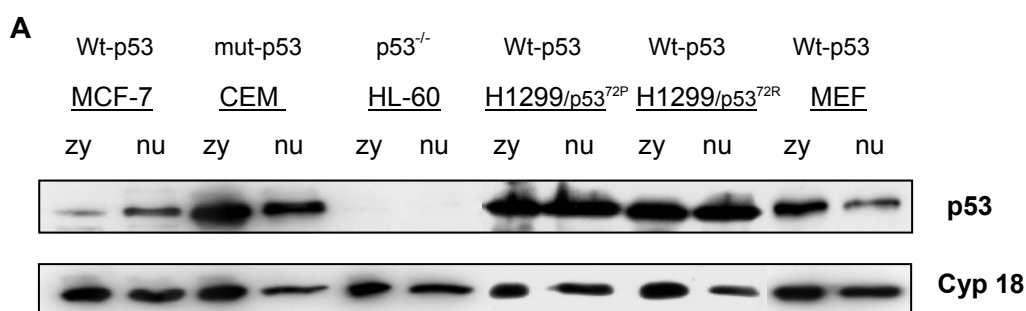
3.2 Analyse der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18

Der Tumorsuppressor p53 ist ein instabiles und konformativ flexibles Protein. Molekulare Chaperone stellen aufgrund dessen ein wichtiges Element für die Regulierung und Aufrechterhaltung des Pools an aktivem p53 dar. Die Interaktion des p53 mit der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18, die in den Proteininteraktionsstudien identifiziert wurde (Abbildung 3.4 D), ist Gegenstand detaillierter Analysen, da das Cyp 18-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Marks, 1991) und der Cyclophilin-Inhibitor CsA Einfluss auf p53-vermittelte Prozesse zeigt (Pyrzynska, 2002).

3.2.1 Biochemische Charakterisierung der Proteine p53 und Cyp 18

3.2.1.1 Subzelluläre Lokalisierung von p53 und Cyp 18

Zum detaillierten Verständnis der Natur der Interaktion beider Proteine ist es notwendig, diese in ihrer zellulären Umgebung biochemisch zu charakterisieren. Die in den proteomischen p53-Interaktionsstudien detektierte Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyp 18 lag im Fokus weiterer biochemischer Analysen. Zunächst erfolgte die subzelluläre Lokalisierung beider Proteine mittels Immunoblot und Immunfluoreszenz in verschiedenen von menschlichem Brust-, Blut- und Lungenkrebs abgeleiteten Zelllinien und embryonalen Mausfibroblasten (Abbildung 3.5 A und B).



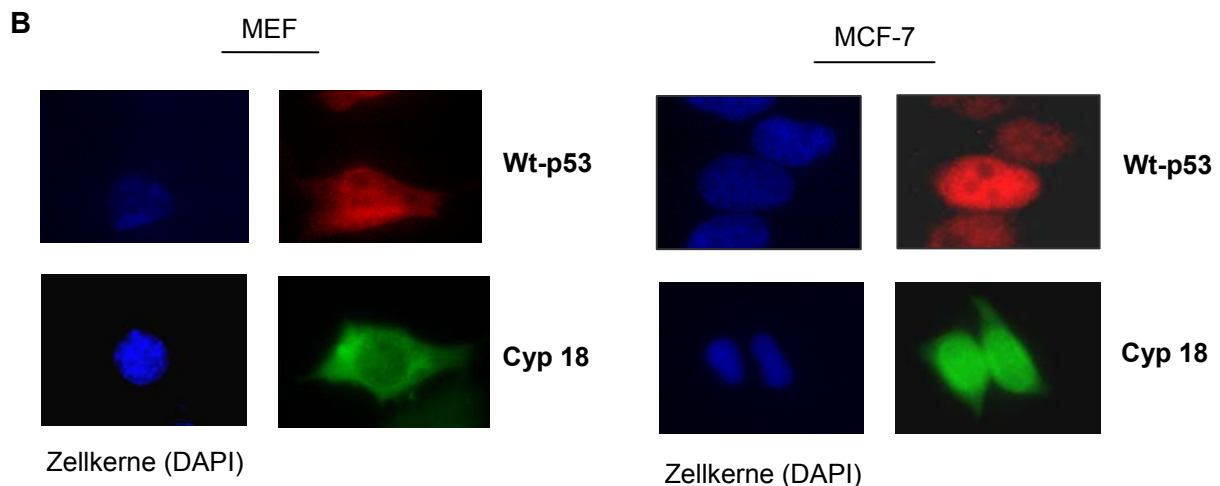


Abbildung 3.5: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine p53 und Cyp 18 in verschiedenen Tumorzelllinien und embryonalen Mausfibroblasten

A: Der Immunoblot zeigt die Verteilung von p53 und Cyp 18 in zytoplasmatischen (zu) und nuklearen (nu) Proteinfractionen verschiedener humaner Zelllinien und embryonaler Mausfibroblasten. **B:** Subzelluläre Lokalisierung von Wt-p53 und Cyp 18 mittels Immunfluoreszenz in embryonalen Mausfibroblasten (MEF) und von Brustkrebs abgeleiteten humanen Zellen (MCF-7).

Beide Proteine wurden in den analysierten Zelllinien sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert. Wildtyp-p53 zeigte in MCF-7- und MEF-Zellen im Vergleich zu der mut-p53-Variante (R175H/R248Q) in CEM-Zellen eine geringere Expression. Die stärkste p53-Expression wiesen die H1299/p53^{72P/R}-Zellen, in denen p53 überexprimiert ist, auf. Die HL-60-Zellen sind p53-negativ und konnten aufgrund dessen in Kontroll-ColP-Experimenten eingesetzt werden. Cyclophilin 18 wurde sowohl im Kern als auch im Zytoplasma aller analysierten Zelllinien detektiert. Die Cyp 18-Protein-Expression erwies sich in allen analysierten Zelllinien und Proteinfractionen als ähnlich hoch.

3.2.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Proteine p53 und Cyp 18

Posttranslationale Modifikationen an Proteinen regulieren deren Konformation, die Bindung von weiteren Proteinen, und somit deren Aktivität und Stabilität. Ziel der folgenden Untersuchungen war die Analyse posttranslationaler Modifikationen der Proteine p53 und Cyp 18 mittels ESI-Massenspektrometrie. Zunächst erfolgte die Anreicherung des Wt-p53 aus der nuklearen Proteinfraction von MCF-7-Zellen über einen Immunaффinitäts-chromatografischen Schritt unter Verwendung des p53-spezifischen Ak 421. Das aufgereinigte p53-Protein wurde anschließend in einem 12.5% SDS-PA-Gel analysiert, die p53-Bande ausgeschnitten, tryptisch verdaut und

anschließend hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen massenspektrometrisch analysiert. Zwei Phosphorylierungsstellen, am Serin-166 und Threonin-170 des Wt-p53, konnten mittels ESI-MS detektiert werden (Abbildung 3.6). Diese sind in der zentralen DNA-Binderegion des p53-Moleküls lokalisiert und bisher nicht in der Literatur beschrieben.

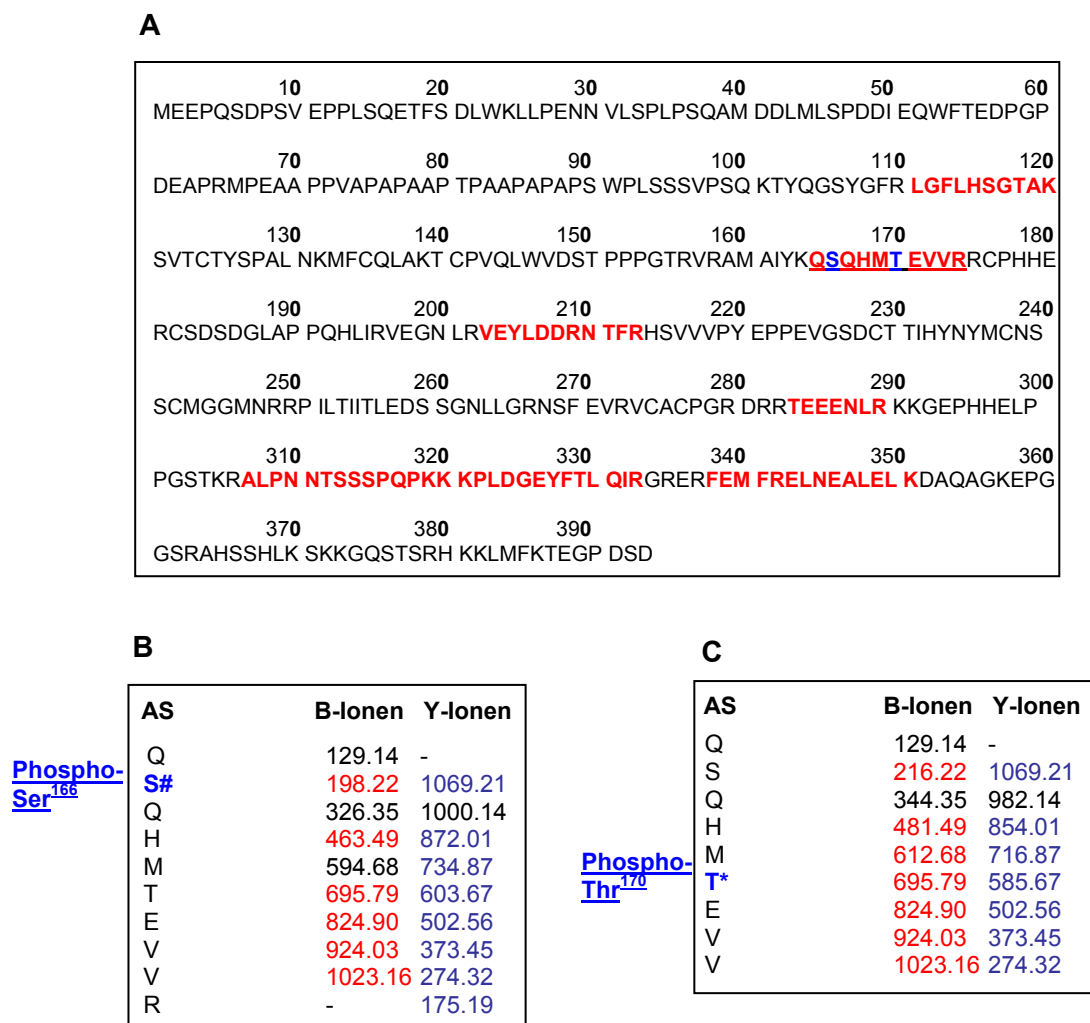
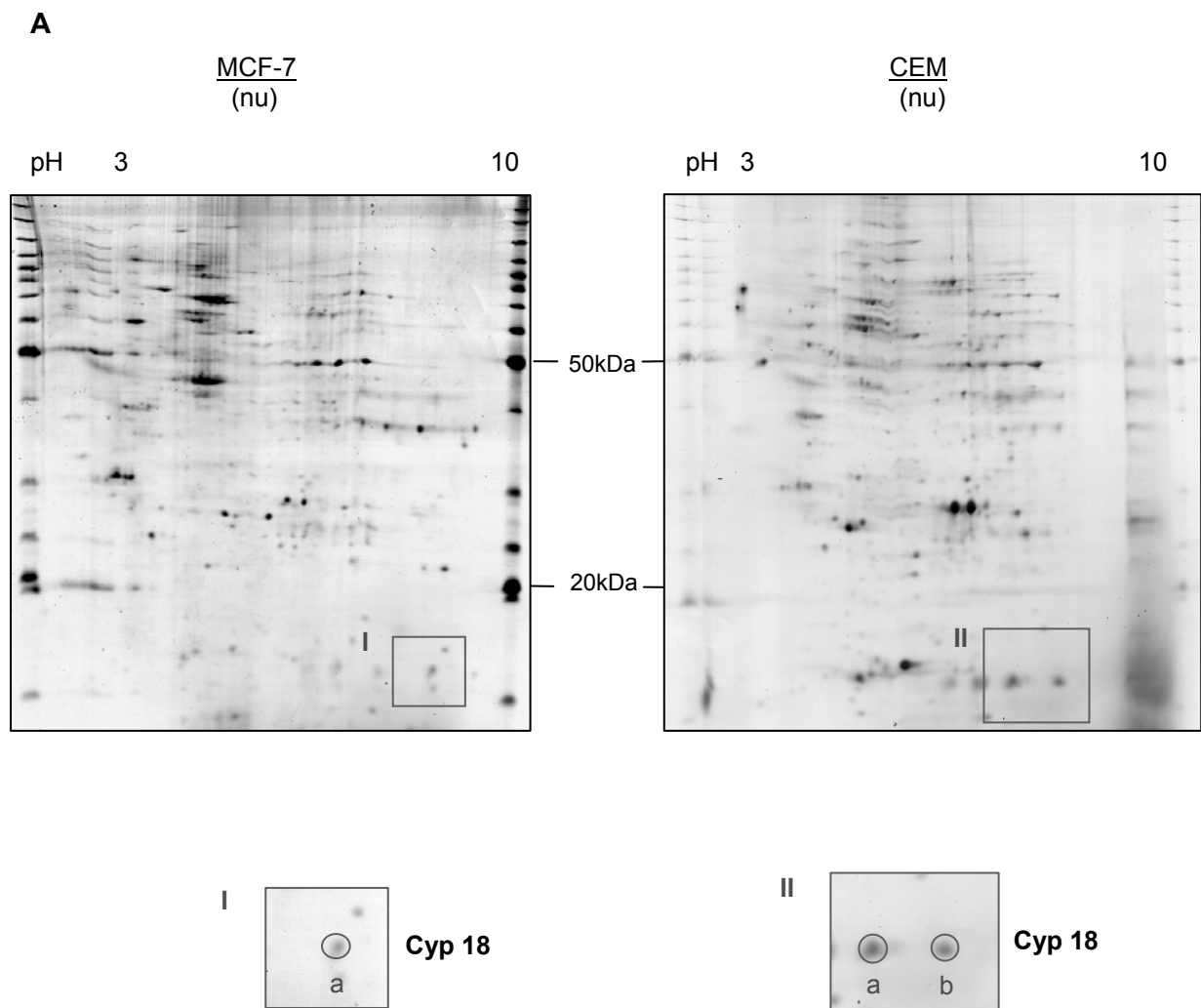


Abbildung 3.6: MS-Analyse posttranslationaler Modifikationen des Wt-p53

Wt-p53 wurde aus der nuklearen Proteinfraction von MCF-7-Zellen über Immunaффinitätschromatografie, bei der der p53-spezifische Ak 421 zur Verwendung kam, angereichert und anschließend mittels ESI-Massenspektrometrie hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen analysiert. **A:** Aminosäure-Sequenz des p53-Proteins; p53-Peptide in Rot wurden mittels ESI-MS detektiert (20% Sequenz-Abdeckung). Die Phosphorylierungsstellen Serin-166 und Threonin-170 sind blau dargestellt. **B-** und **Y-Serien** des unterstrichenen p53-Peptids (AS165-174) mit den jeweils detektierten Phosphorylierungsstellen: **B:** B- und Y-Ionenserien des p53-Peptides AS 165-174 mit phosphoryliertem Serin-166 **C:** B- und Y-Ionenserien des p53-Peptides AS 165-174 mit phosphoryliertem Threonin-170.

Das Cyclophilin 18-Protein hat einen isoelektrischen Punkt (pI) von 7.68 (nach www.uniprot.org/uniprot/P62937). Die Cyp 18-Isoform mit einem pI von 6.88 ist in die Anheftung des HI-Virions an die Oberfläche der Zielzellen involviert und zwei weitere Isoformen mit pI von 6.40 und 6.53 regulieren die Konformation des HIV-1 Kapsid-Proteins (Misumi, 2002). Zur detaillierten Analyse des Auftretens von Cyp 18-Isoformen in den hier verwendeten zellulären Systemen wurden gesamtzelluläre Proteinfractionen von H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zellen sowie nukleare Proteinfractionen von MCF-7- und CEM-Zellen mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt und die resultierenden Gele anschließend Coomassie-gefärbt (Abbildung 3.7A, B). Potentielle Cyp 18-Proteinspots (Abbildung 3.7, A: Ia; IIa, b; B: IIIa, b, c; IVa, b, c) wurden tryptisch im Gel verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert.



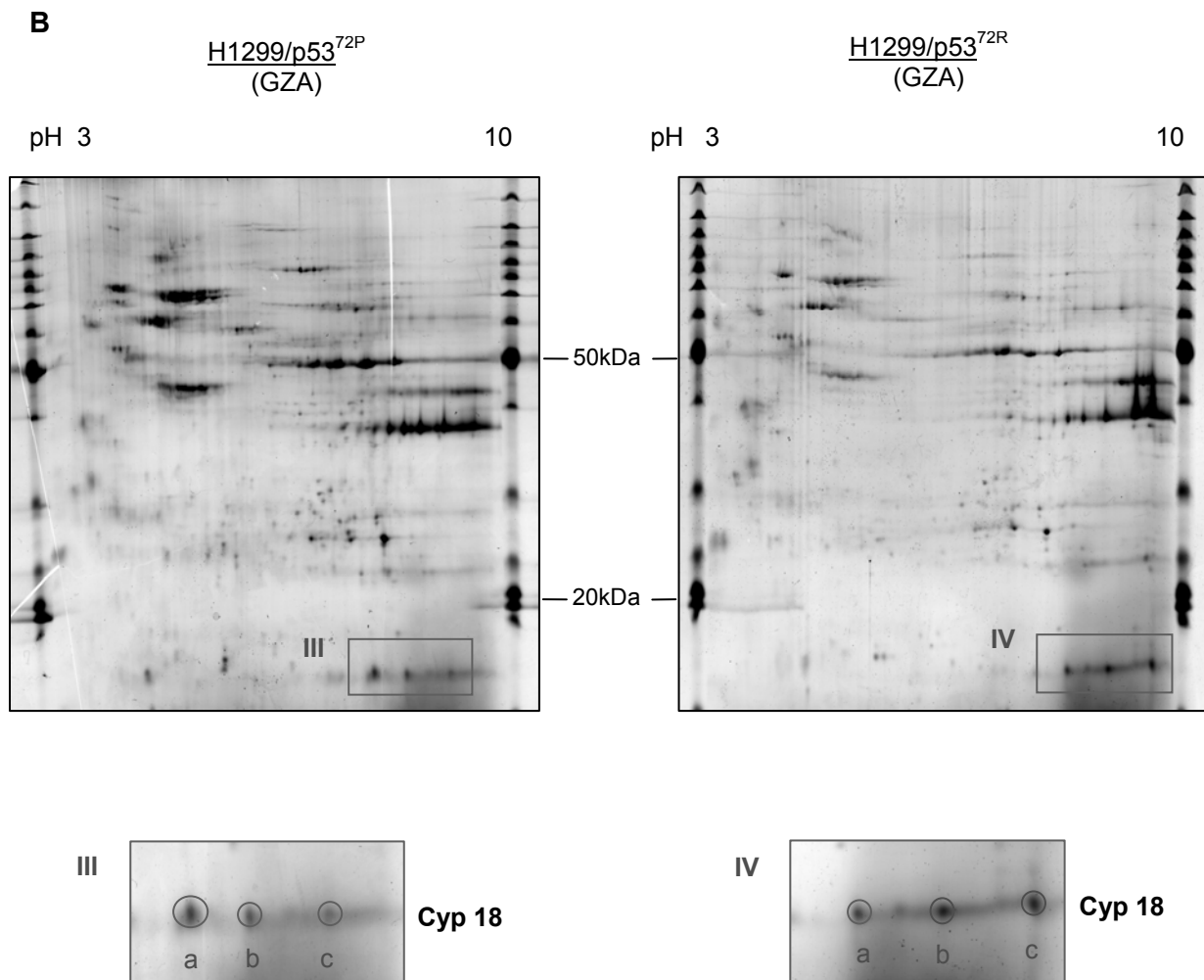


Abbildung 3.7: Detektierung von Cyclophilin 18 – Isoformen in der 2D-Gel-Analyse

A: Nukleare Proteinfraktionen (nu) von MCF-7- und CEM-Zellen und **B:** gesamtzelluläre Proteinfraktionen (GZA) von H1299/p53^{72P} und H1299/p53^{72R} wurden mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt und die 2D-SDS-Polyacrylamidgele anschließend Coomassie-gefärbt. Die umrahmten Proteinspots a, b, und c in den Abschnitten I, II, III und IV, welche ausgeschnitten, im Gel tryptisch verdaut und anschließend mittels ESI-MS analysiert wurden, konnten als Cyp 18 identifiziert werden.

Sowohl in den nuklearen Proteinfraktionen der MCF-7- und CEM-Zellen als auch in den gesamtzellulären Proteinfraktion der H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zellen wurden mehrere Cyp 18-Isoformen, die sich hinsichtlich ihres isoelektrischen Punkts unterscheiden, mittels ESI-MS detektiert. Die massenspektrometrische Analyse post-translationaler Modifikationen des Cyp 18-Proteins ergab bei zwei der analysierten Cyp 18-Isoformen (Abbildung 3.7, Spot III a und IV a) jeweils Acetylierungsstellen am Lysin-28 beziehungsweise Lysin-44 (Abbildung 3.8 A und B).

A

10	20	30	40	50	60
MVNPTVFFDI	AVDGEPLGR	V SFELFADKVP K	TAENFR	ALS TGEKGFQYK	G SCFHR IIPGF
70	80	90	100	110	120
MCQGGDFTRH	NGTGGK SIYG EK	FEDENFIL	KHTGPGILSM	ANAGPNTNGS	QFICTAKTE
130	140	150	160		
WLDGKHVVFG	KVKEGMNIVE AMER	FGSRNG	KTSKKITIAD	CGQLE	

B

AS	B-Ionen	Y-Ionen
V	100.08	-
S	187.11	1322.70
F	334.18	1235.67
E	463.22	1088.60
L	576.30	959.56
F	723.37	846.47
A	794.41	699.40
D	909.44	628.37
K~	1079.54	513.34
V	1178.61	343.23
P	1275.66	244.17
K	-	147.11

Acetyl-Lys²⁸

C

AS	B-Ionen	Y-Ionen
A	72.04	-
L	185.13	1228.62
S	272.16	1115.54
T	373.21	1028.50
G	430.23	927.46
E	559.27	870.44
K~	729.38	741.39
G	786.40	571.29
F	933.47	514.27
G	990.49	367.20
Y	1153.55	310.18
K	-	147.11

Acetyl-Lys⁴⁴

Abbildung 3.8: MS-Analyse posttranslationaler Modifikationen des Cyp 18-Proteins

Die massenspektrometrische Analyse der Cyp 18-Isoformen in den H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zellen ergab zwei Acetylierungsstellen an den Lysinen 28 und 44 des Cyp 18-Proteins. **A:** Aminosäure-Sequenz des Cyp 18-Proteins, Cyp 18-Peptide in Rot wurden mit einer Sequenzabdeckung von 39% in der ESI-MS-Analyse detektiert. Die Acetylierungsstellen Lysin-28 und Lysin-44 sind blau dargestellt. B- und Y-Serien der unterstrichenen p53-Peptide (AS 20-31 bzw. AS 38-49) mit den jeweils detektierten Acetylierungsstellen: **B:** B- und Y-Ionenserien des Cyp 18-Peptides AS 20-31 mit acetyliertem Lysin-28 **C:** B- und Y-Ionenserien des Cyp 18-Peptides AS 38-49 mit acetylierten Lysin-44.

3.2.2 Charakterisierung der p53/Cyclophilin 18-Interaktion

3.2.2.1 *In vitro* Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion

Proteine interagieren innerhalb der Zelle in Netzwerken miteinander. Zum Nachweis der direkten Interaktion von p53 und Cyp 18 wurden rekombinant hergestellte, hochgereinigte p53- und Cyp 18-Proteine zu Interaktionsstudien verwendet. Zunächst erfolgte der Nachweis der direkten Interaktion beider rekombinant hergestellten Proteine mit Hilfe der Far- Western-Analyse. Hierzu wurde p53 direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgegeben (Abbildung 3.9 A), beziehungsweise in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Abbildung 3.9 B), und anschließend mit einer Cyp 18-haltigen

Lösung inkubiert. Eine p53/Cyp 18-Bindung konnte anschließend mit Hilfe des anti-Cyp 18 Ak nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden rek. p53 und rek. Cyp 18 in CoIP-Experimenten, unter Verwendung des anti-p53 Ak DO-1 beziehungsweise des anti-Cyp 18 Ak, eingesetzt (Abbildung 3.9 C). Um die physiologischen Umstände in der Zelle zu reflektieren, wurde ein molekularer Überschuss des Cyp 18 (5.7 μM) über p53 (0.7 μM) eingesetzt. Sowohl in der Far-Western-Analyse als auch in den CoIP-Experimenten erfolgte der Nachweis einer direkten Interaktion beider Proteine.

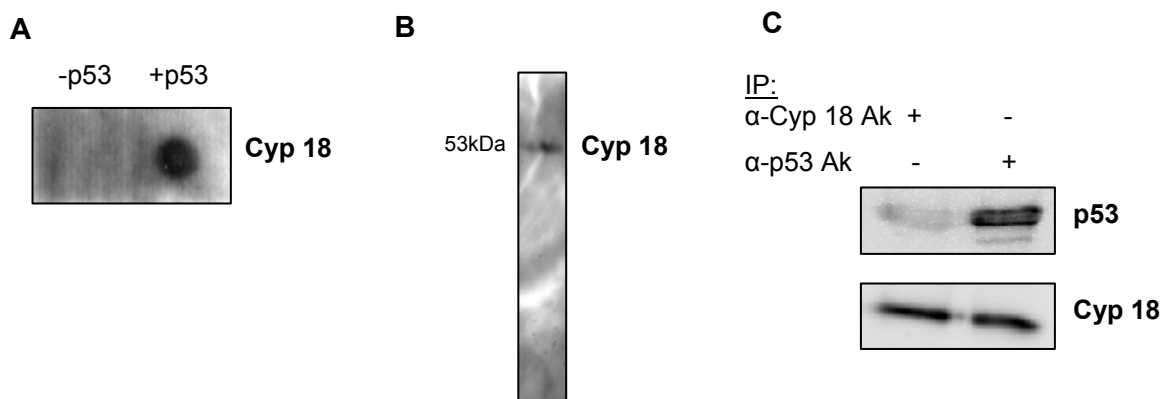


Abbildung 3.9: *In vitro* Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion

Die Immunoblots (A, B und C) zeigen den Nachweis der direkten Interaktion zwischen rek. p53 und rek. Cyp 18. **A:** Dot-Blot mit p53 und anschließender Far-Western-Analyse unter Verwendung von Cyp 18. **B:** SDS-PAGE und Western-Blot mit p53 und anschließender Far-Western-Analyse mit Cyp 18. **C:** Die Immunoblots zeigen CoIP-Experimente, die unter Verwendung von rek. p53 und rek. Cyp 18, mit dem anti-p53 Ak DO-1 beziehungsweise dem anti-Cyp 18 Ak, durchgeführt wurden.

Weitere Analysen beinhalteten die Überprüfung einer potentiellen Involvierung des aktiven Zentrums des Cyclophilin 18-Enzyms in die p53-Interaktion. Hierzu wurde 5.7 μM rek. Cyp 18-Protein mit 5.8 μM bzw. 58 μM Cyclosporin A, einem Immunsuppressivum und Inhibitor des aktiven Zentrums des Cyp 18, für 30 min vorinkubiert. Nachfolgend wurden CoIP-Experimente unter Verwendung von 0.7 μM rek. p53 und dem p53-spezifischen Ak DO-1 durchgeführt (Abbildung 3.10 A). Mit steigenden Mengen an CsA konnte die Interaktion von Cyp 18 und p53 inhibiert werden. Beim Einsatz von 58 μM CsA kam es zur Reduzierung der Cyp 18/p53-Bindung um etwa 60%. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei CoIP-Experimenten in denen eine Cyp 18-Variante eingesetzt wurde, die eine Mutation im aktiven Zentrum (Q62T) erhielt, keine Interaktion zwischen beiden Proteinen stattfand (Abbildung 3.10 B). Der Nachweis der Co-Immunopräzipitation des Cyp 18-Proteins erfolgte jeweils mittels hoch-sensitiver MS-Analysen.

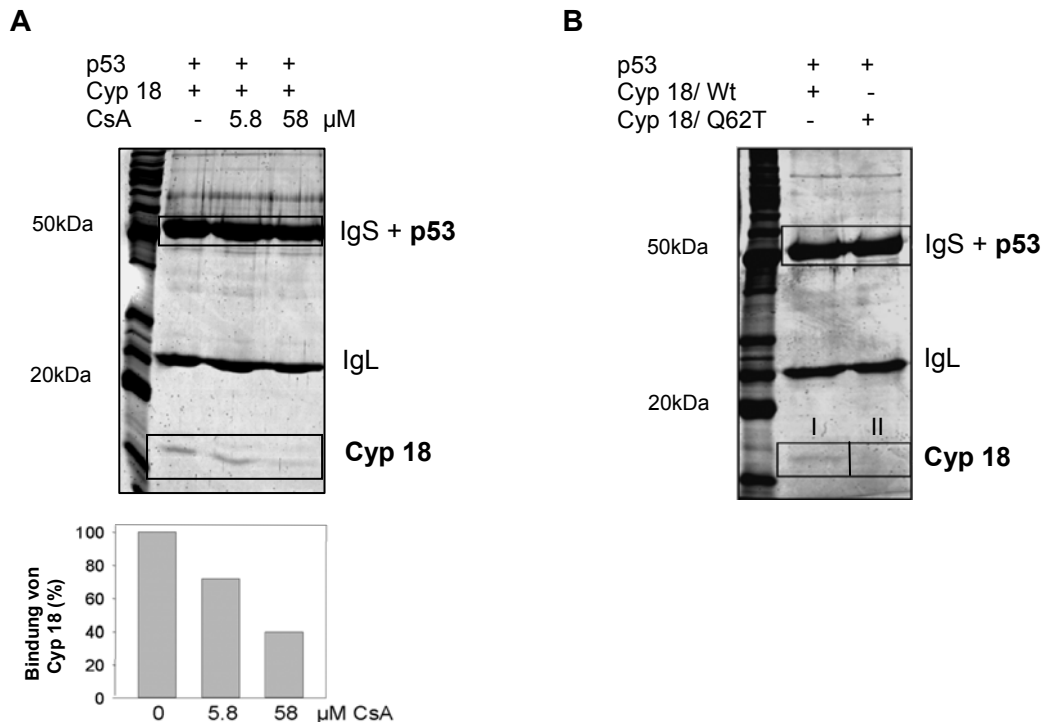


Abbildung 3.10: Involvierung des aktiven Zentrums des Cyp 18-Enzyms in die p53-Interaktion

Die Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgele zeigen den Nachweis der Involvierung des aktiven Zentrums des Cyp 18-Enzyms in die p53-Interaktion. **A:** Die CoIP-Experimente wurden mit 0.7 μ M rek. p53, 5.7 μ M rek. Cyp 18 und dem anti-p53 Ak DO-1 durchgeführt. Cyp 18 wurde mit steigenden Mengen (5.8 μ M und 58 μ M) des Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor des aktiven Zentrums von Cyp 18, vorinkubiert. Der Nachweis der p53- und Cyp 18-Proteine im Gel (umrahmte Bereiche) wurde mittels ESI-MS-Analyse erbracht. **B:** CoIP-Experimente mit 0.7 μ M rek. p53 und 5.7 μ M rek. Cyp 18 bzw. 5.7 μ M einer Cyp 18-Variante mit einer Mutation im aktiven Zentrum (Q62T) wurden mit dem anti-p53 Ak DO-1 durchgeführt. Der Nachweis der p53- und Cyp 18-Proteine in den umrahmten Gel-Bereichen erfolgte mittels massenspektrometrischer Analysen. Im umrahmten Bereich I wurde Wt Cyp 18 detektiert. Der Bereich II hingegen enthielt kein Cyp 18/Q62T.

3.2.2.2 Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion in lebenden Zellen

Zur Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion in Zellen wurden zytoplasmatische und nukleare Proteinextrakte sowohl von humanen Tumorzelllinien, die sich durch unterschiedlichen p53-Status auszeichnen, als auch von embryonalen Maus-fibroblasten und humanen peripheren Blutlymphozyten gesunder Probanden hinsichtlich des Auftretens der p53/Cyp 18-Interaktion analysiert. Zunächst wurden sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteinextrakte der humanen T-lymphoblastischen Zelllinie CEM (mut-p53/R175H,R248Q), der von humanem Brustkrebs abgeleiteten Zelllinie MCF-7 (Wt-p53), der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF, Wt-p53) und der humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL, Wt

p53) hergestellt und diese bezüglich des subzellulären Auftretens der Proteine p53 und Cyp 18 mittels Immunoblot untersucht (Abbildung 3.11 A). Weiterhin wurden die nuklearen und zytoplasmatischen Proteinfraktionen der jeweiligen Zelllinien hinsichtlich einer p53/Cyp 18-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation und Immunoblot analysiert (Abbildung 3.11 B). In den Kontrolllexperimenten, in denen die p53-negative HL-60-Zelllinie zur Verwendung kam, konnte in den MS-Analysen kein Cyp 18 detektiert werden (Abbildung 3.11 C, Bereiche a und b). Das Cyp 18-Protein ist mit p53 unabhängig der jeweilig exprimierten p53-Spezies und deren subzellulärer Lokalisation assoziiert. Folglich interagieren Wt-p53 und mut-p53 (R175H, R248Q) gleichermaßen mit Cyp 18.

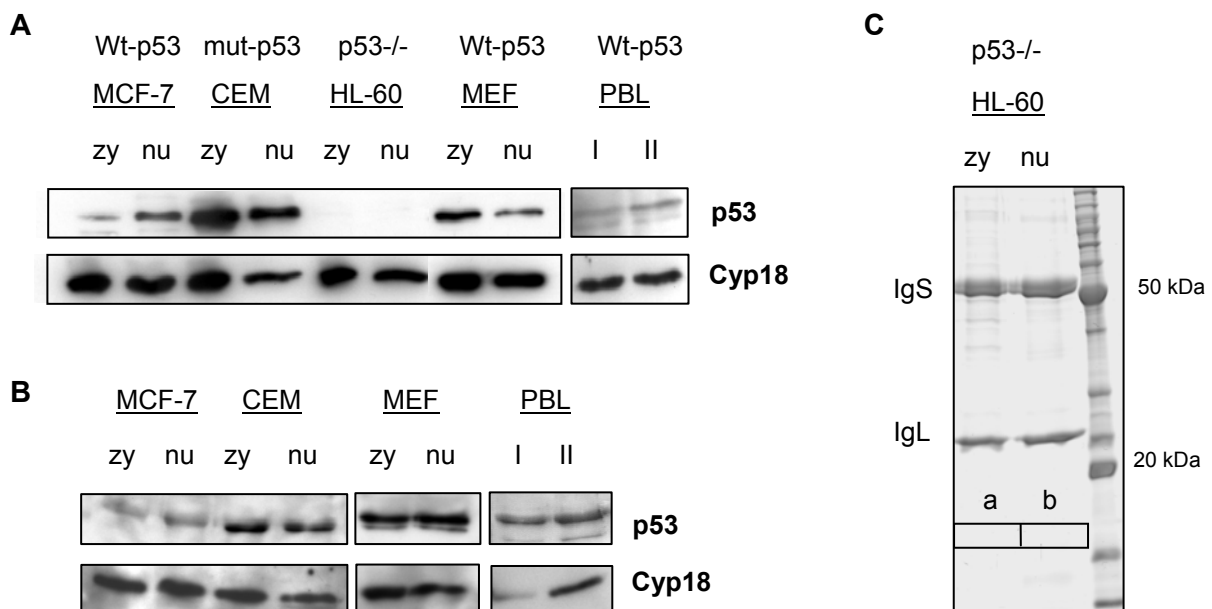
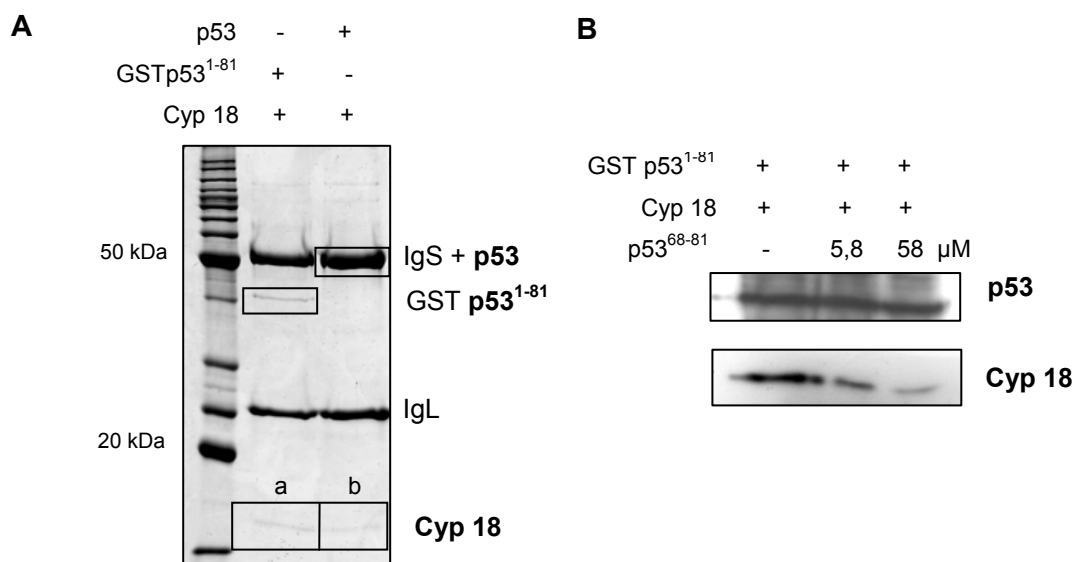


Abbildung 3.11: Analyse der Interaktion von p53 und Cyp 18 in verschiedenen Zelllinien

A: Der Immunoblot zeigt die Detektion von p53 und Cyp 18 in zytoplasmatischen (zy) und nuklearen (nu) Proteinextrakten verschiedener Zelllinien (MCF-7, CEM, HL-60, MEF) und PBL zwei verschiedener gesunder Probanden (I und II) mit unterschiedlichem p53-Status. Der Proteinauftrag entspricht etwa 15% der für die CoIP-Experimente (B und C) eingesetzten Proteinmenge. **B:** Der Immunoblot zeigt die Detektion von p53 und Cyp 18 in Proteinproben aus CoIP-Experimenten, welche mit dem p53-spezifischen Antikörper DO-1 durchgeführt wurden. **C:** Kontroll-CoIP-Experimente unter Verwendung von zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakten der p53-negativen HL-60-Zelllinie. Die umrahmten Bereiche a und b im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel wurden hinsichtlich des Auftretens von Cyp 18 mittels ESI-MS analysiert.

Weitere Untersuchungen umfassten die lokale Eingrenzung der Cyp 18-Binderegion im p53-Protein. Die N-terminal gelegene Prolin-reiche Region des p53-Proteins, welche die AS 64-92 umfasst und fünf PXXP-Motive enthält, stellt einen potentiellen Bindebereich für die Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyp 18 dar. Der Prolin-reiche Bereich der AS 64-82 des p53-Proteins, welcher partielle Sequenzhomologie mit einem HIV-1 Kapsidprotein, für das die Struktur der Cyp 18-Interaktion vorliegt (Gamble, 1996), aufweist, lag aufgrund dessen im Fokus weiterer Untersuchungen. Zunächst wurde in CoIP-Experimenten gezeigt, dass ein N-terminales p53-Fragment (p53¹⁻⁸¹), welches die AS 1-81 umfasst und damit die Prolin-reiche Region beinhaltet, mit rek. Cyp 18 interagiert (Abbildung 3.12 A). Diese Interaktion konnte weiterhin durch Vorinkubation des Cyp 18 mit steigenden Mengen eines p53-Peptids (p53⁶⁸⁻⁸¹), welches die Prolin-reiche Sequenz (AS 68-81) des p53 umfasst, inhibiert werden (Abbildung 3.12 B). Dies deutet auf eine Involvierung der Prolin-reichen Region des p53 in die Interaktion mit Cyp 18. Ein weiteres Eingrenzen der Interaktionsstelle des Cyp 18 am p53-Protein erfolgte durch CoIP-Analysen mit p53-Varianten, die einen natürlich vorkommenden Polymorphismus an der AS-Position 72 (Arg/Pro) enthalten. Zur Verwendung kamen stabil transfizierte H1299-Zellen, die die jeweiligen Polymorphismus-Varianten p53^{72P} und p53^{72R} enthalten. Zunächst erfolgte die subzelluläre Lokalisierung der Proteine p53 und Cyp 18 (Abbildung 3.12 C). Weiterhin wurden CoIP-Experimente mit zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakten der Zelllinien H1299/p53^{72P} und H1299/p53^{72R} durchgeführt. Die p53-Variante, die an der AS-Position 72 ein Prolin enthält (p53^{72P}), interagiert stärker mit Cyp 18 als die p53-Variante mit einem Arginin an Position 72 (p53^{72R}) (Abbildung 3.12 D).



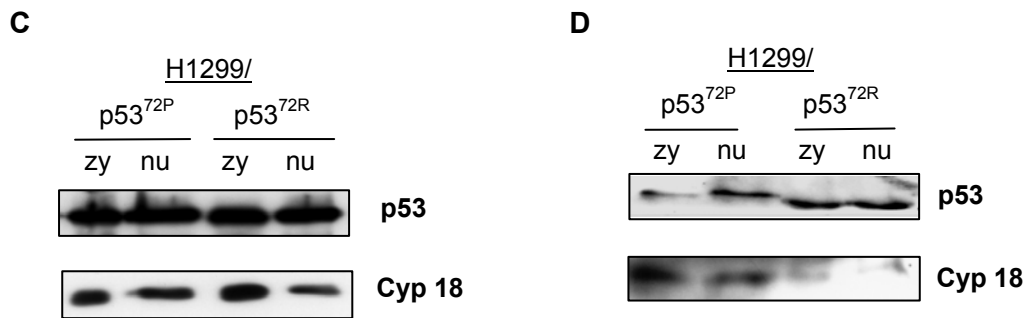


Abbildung 3.12: Cyp 18 interagiert mit der Prolin-reichen Region des p53-Proteins

A: Das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt CoIP-Analysen, durchgeführt mit dem p53-spezifischen Ak DO-1, 0,7 µM eines N-terminalen p53-Fragments (p53¹⁻⁸¹), beziehungsweise 0,7 µM des p53-Volllängenproteins und 5,7 µM Cyp 18. In den Gel-Bereichen a und b erfolgte die Identifizierung des Cyp 18-Proteins mittels ESI-MS-Analyse. Densitometrische Analysen ergaben, dass etwa 0,5% der eingesetzten Menge an Cyp 18 präzipitiert wurde. **B:** Der Immunoblot zeigt die Inhibierung der p53/Cyp 18-Interaktion durch ein p53-Peptid, welches die Prolin-reiche Region (AS 68-81) des p53-Proteins repräsentiert (p53⁶⁸⁻⁸¹, ⁶⁸EAAPPVAPAPAAAPT⁸¹). CoIP-Experimente wurden sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen des p53⁶⁸⁻⁸¹-Peptids durchgeführt. Die resultierenden Proteinproben wurden mittels Immunoblot-Analyse ausgewertet. **C, D:** Die Immunoblots zeigen den Einfluss des Aminosäure-Polymorphismus im Codon 72 des p53-Gens auf die Interaktion des p53-Proteins mit Cyp 18. **C:** p53- und Cyp 18-Detektierung in zytoplasmatischen (zy) und nuklearen (nu) Proteinextrakten der Zelllinien H1299/p53^{72P} und H1299/p53^{72R}. Der Proteinauftrag entspricht etwa 15% der in den CoIP-Experimenten eingesetzten Proteinmenge. **D:** Die CoIP-Experimente wurden mit dem p53-spezifischen Ak DO-1 und den zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfractionen der H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zelllinien durchgeführt. Die jeweiligen Immunoblots wurden mit einem anti-Cyp 18 Ak und der biotinylierten Variante des anti-p53-Ak DO-1 analysiert. Densitometrischen Analysen zufolge präzipitierte die p53^{72R}-Variante fünfmal weniger Cyp 18 im Vergleich zur p53^{72P}-Variante.

Die Experimente ergaben, dass p53 mit Teilen seines Prolin-reichen Bereichs, um die Aminosäure Prolin-72, in das aktive Zentrum des Cyp 18-Enzyms bindet.

3.2.3 Der Einfluss der p53/Cyp 18-Interaktion auf die p53-Funktion

Die Auswirkung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Interaktion des Cyp 18-Proteins mit dem Tumorsuppressor p53 auf dessen zelluläre Funktionen, speziell dessen Sequenz-spezifische DNA-Bindeaktivität, wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurden Band-Shift-Analysen durchgeführt, in denen ein molarer Überschuss von Cyp 18 über p53 verwendet wurde, um die molekularen Verhältnisse beider Proteine innerhalb der Zelle zu reflektieren (Abbildung 3.13). Eine 30-minütige Vorinkubation von 69 nM p53 mit 8,3 µM Cyp 18 resultierte in einer Verminderung

der Bindung des p53 an dessen Konsensus-DNA (5'-TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGG-3'), deren Sequenz vom Promoter des humanen gadd45-Gens abgeleitet ist (Bahnen 3 und 5). Im Gegensatz dazu führte eine Vorinkubation von 69 nM p53 mit 8.3 μ M einer Variante des Cyp 18 (Cyp 18/Q62T), welche eine Mutation im aktiven Zentrum trägt, zu keiner Veränderung der Menge des im Gel verzögerten p53/DNA-Komplexes (Bahnen 3 und 6). Zum Nachweis der Spezifität des verzögerten p53/DNA-Komplexes erfolgte eine Vorinkubation des p53-Proteins mit dem p53-spezifischen Antikörper DO-1, die einen Supershift zur Folge hatte (Bahn 4).

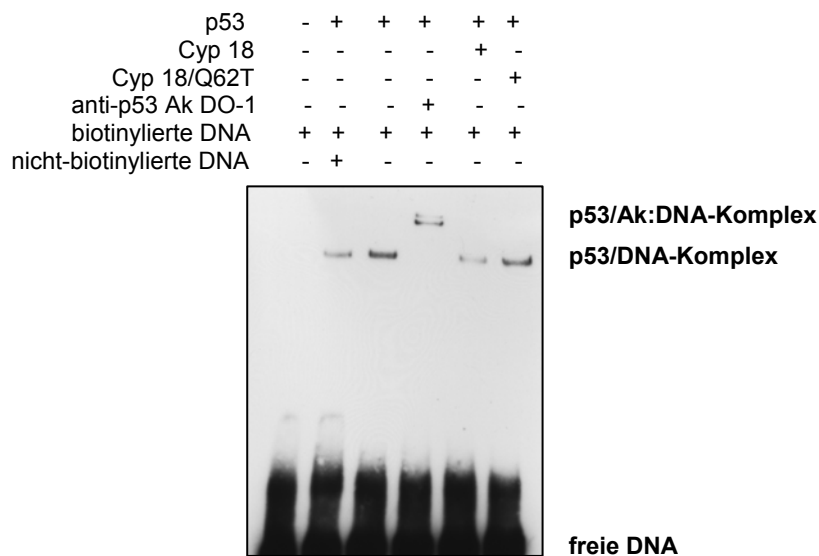


Abbildung 3.13: Cyp 18 inhibiert die Sequenz-spezifische p53/DNA-Bindung *in vitro*

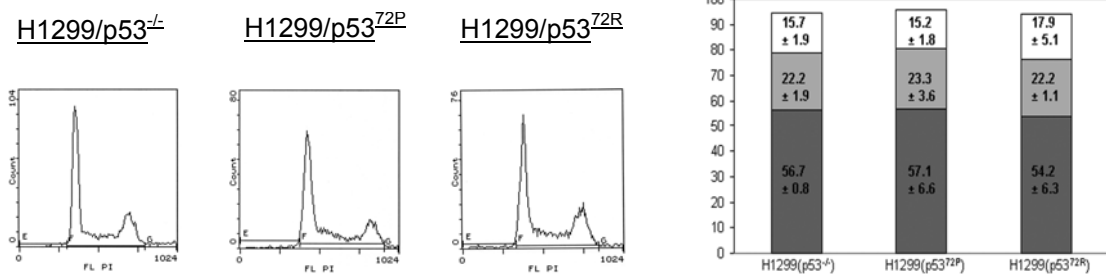
EMSA: Bahn 1: kein DNA-Shift in Abwesenheit von p53, Bahn 2: Reduzierung des Shifts durch ein unmarkiertes Oligonukleotid (neg. Kontr.), Bahn 3: geshiftete DNA in Gegenwart von p53, Bahn 4: Supershift induziert durch anti-p53 Ak DO-1, Bahn 5: Verringerung der Menge der geshifteten DNA durch Cyp 18, Bahn 6: durch Cyp 18/Q62T unbeeinflusster DNA-Shift.

Die Resultate der EMSA-Experimente ergaben, dass Cyp 18 die Bindung des p53-Proteins an seine Konsensus-DNA-Sequenz *in vitro* abschwächt.

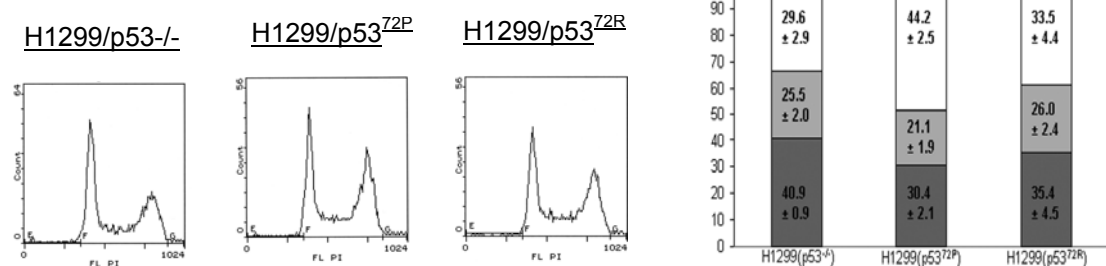
Aufgrund der Beobachtungen der Inhibition der p53/Cyp 18-Interaktion durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) und des negativen Einflusses der Cyp 18-Interaktion auf die p53/DNA-Bindung *in vitro* (Abb. 3.10 und 3.13), erfolgte die Analyse des Einflusses von CsA auf p53-Funktionen, wie beispielsweise Zellzyklusregulation und p53-Zielgen-Expression. Hierzu wurden die H1299/p53^{-/-}, H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zelllinien jeweils, sowohl unbehandelt (Kontrolle) als auch nach CsA-Behandlung (500 nM CsA, 4 h), mittels FACS-Analyse hinsichtlich der Verteilung der Zellzyklusphasen, beziehungsweise mittels

Immunoblot bezüglich der Expression der Proteine p53 und Cyp 18, untersucht (Abbildung 3.14 A und B).

A I: Kontrolle



II: CsA-Behandlung (500nM CsA, 4h)



B

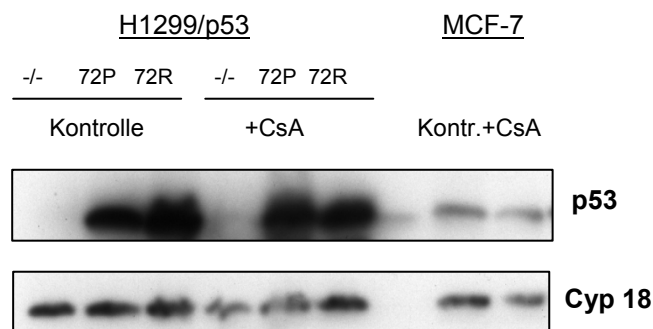


Abbildung 3.14: p53-abhängige Änderung der Verteilung der Zellzyklusphasen nach Cyclosporin A-Behandlung

A: Die FACS-Histogramme zeigen die Zellzyklusverteilung logarithmisch wachsender H1299/p53^{-/-}, H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zellen jeweils unbehandelt (I) und nach 4 h Behandlung mit 500 nM CsA (II). In jedem einzelnen Experiment wurden etwa 10000 Zellen analysiert. Die Anzahl der Zellen (count) wurde als Funktion des DNA-Gehalts (FL PI) aufgetragen. Die Zellzyklusverteilung der Experimente, dargestellt in Prozent (%), ist jeweils rechts der Histogramme angegeben. Der Durchschnitt und die Standardabweichung wurden aus vier verschiedenen Experimenten berechnet. (Schattierung: dunkelgrau - G1-Phase; hellgrau – S-Phase; weiß - G2/M-Phase). **B:** Die Immunoblots zeigen die jeweilige Verteilung des Wt-p53 und des Cyp 18 mit und ohne CsA-Behandlung in Ganzzellaufschlüssen von H1299(p53^{-/-}), H1299(p53^{72P}), H1299(p53^{72R}) und MCF-7-Zellen. Die jeweiligen Immunoblots wurden mit den DO-1 Antikörper und dem anti-Cyp 18 Ak analysiert.

Die unbehandelten H1299/p53^{-/-}, 72P, 72R - Zelllinien zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Zellzyklusverteilung (Abbildung 3.14 A I). Eine vierstündige Behandlung der jeweiligen Zelllinien mit 500 nM CsA resultierte in einer signifikanten p53-abhängigen Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, mit einem korrespondierenden Abfall der Zellmenge in der G1-Phase, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 3.14 A II). Die Menge der Zellen in der G2/M-Population stieg von 16% auf 30% in H1299/p53^{-/-} und von 18% auf 34% in H1299/p53^{72R}-Zellen an. Gleichzeitig kam es zu einer Verringerung der Menge der Zellen in der G1-Phase von 57% auf 41% in der H1299/p53^{-/-} und von 54% auf 35% in der H1299/p53^{72R}-Zelllinie. Die stärksten Veränderungen, ausgelöst durch die CsA-Behandlung, konnten bei der H1299/p53^{72P}-Zelllinie beobachtet werden. Die Menge der Zellen in der G2/M-Population stieg von 15% auf 44% an. Gleichzeitig sank die Zellmenge der G1-Population von 57% auf 30%. Die Menge der Zellen die sich in der S-Phase befinden zeigte sich weitgehend unbeeinflusst. Der Anstieg der G2/M-Population der H1299/p53^{72P}-Zellen war statistisch signifikant (nach Student's T-Test Kriterien). Diese Daten zeigen, dass eine Änderung der Aminosäure 72 des p53-Proteins von Arginin zu Prolin in einem isogenen zellulären Hintergrund die Empfindlichkeit p53-positiver Zellen auf den Cyp 18-Inhibitor und Immunsuppressivum CsA in einem zellulären Zusammenhang beeinflusst. Des Weiteren erfolgte die Detektierung von Cyp 18 und p53 in den H1299/p53^{-/-}, 72P, 72R-Zelllinien vor und nach Behandlung der Zellen mit 500 nM CsA für 4 h (Abbildung 3.14 B). Es wurde kein signifikanter Unterschied der Mengen beider Proteine, ausgelöst durch die CsA-Behandlung, festgestellt. Ein Vergleich der H1299-Zelllinien, die p53 in den unterschiedlichen Polymorphismus-Varianten exprimieren, mit endogen Wt-p53-exprimierenden MCF-7-Zellen, ergab eine signifikant geringere Expression des endogenen Wt-p53 in MCF-7-Zellen. Die CsA-Behandlung (500 nM, 4 h) zeigte auf die p53- und die Cyp 18-Expression der analysierten Zelllinien keinen wesentlichen Einfluss.

Weiterhin wurde der Einfluss der CsA-Behandlung auf die Expression des prominenten p53-Zielgens Mdm2 in den H1299/p53^{-/-}, 72P, 72R -Zelllinien untersucht (Abbildung 3.15).

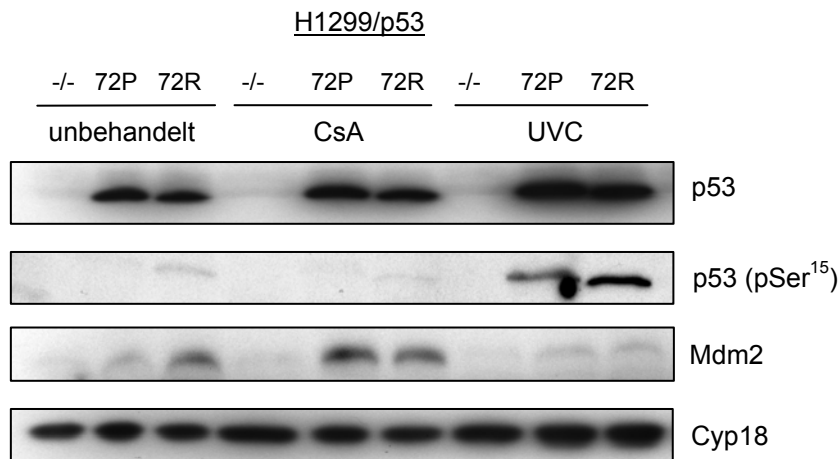


Abbildung 3.15: p53-Aktivierung und p53-Zielgen-Expression nach Cyclosporin A-Behandlung und UVC-Bestrahlung

H1299/p53^{-/-}, H1299/p53^{72P}- und H1299/p53^{72R}-Zellen wurden mit 500 nM CsA behandelt beziehungsweise mit 25 J/m² UVC bestrahlt, und anschließend für 4h weiterkultiviert. In den Ganzzellaufschlüssen erfolgte die Detektierung von p53, p53 mit Phosphorylierung am Serin-15, Mdm2 und Cyp 18 mittels Immunoblot.

Durch die Behandlung der Zellen mit 500 nM CsA für 4 h kam es im Vergleich zur UVC-Bestrahlung der Zellen mit 25 J/m² zu keinem signifikanten Anstieg des p53-Levels und der Phosphorylierung des Serin-15 des p53. Eine erhöhte Expression des p53-Zielgens Mdm2 hingegen wurde p53-abhängig nach CsA-Behandlung beobachtet. Die Induktion der Mdm2-Expression erfolgte stärker durch die p53^{72P}-Variante, war jedoch generell unabhängig von der Ser¹⁵-Phosphorylierung des p53-Proteins.

4 Diskussion

Der Tumorsuppressor p53 fungiert als stress-aktivierter Transkriptionsfaktor, der die Transkription verschiedener Gene, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind, reguliert. Eine Anzahl von Signalwegen, wie beispielsweise die DNA-Schadensantwort, die Zellzykluskontrolle und die Induktion von Apoptose, werden durch p53 kontrolliert (Abbildung 4.1) (Vogelstein, 2000).

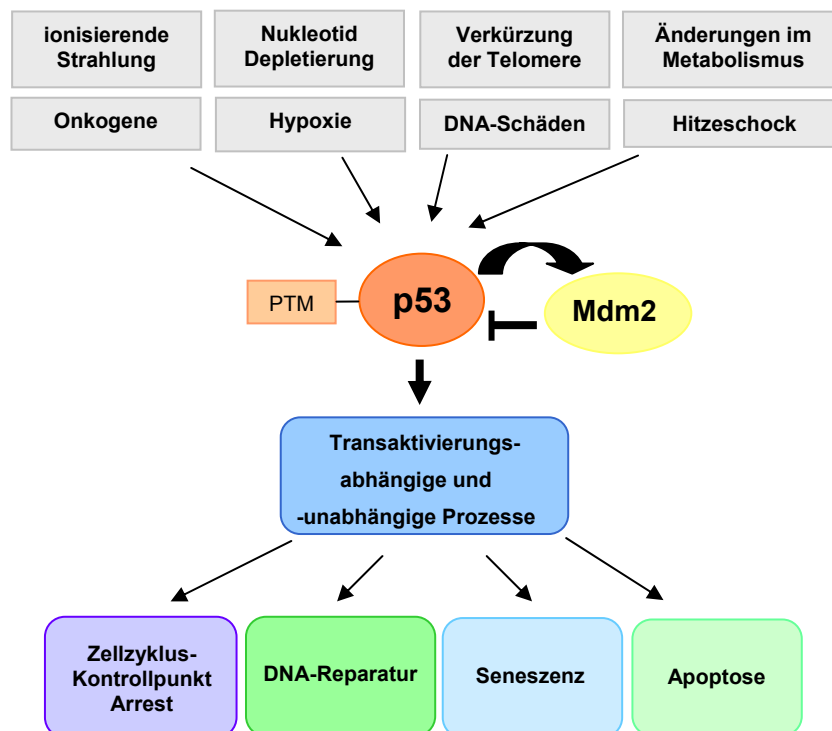


Abbildung 4.1: Aktivierung, Regulation und Funktionen des p53-Proteins

(PTM – posttranslationale Modifikationen)

Die Regulierung zellulärer Prozesse durch p53, wie zum Beispiel die Transkription, die DNA-Replikation und -Reparatur, erfolgt überwiegend durch Protein-Interaktionen und posttranslationale Modifikationen der beteiligten Komponenten. Das p53-Protein besitzt als tetrameres, instabiles und konformationell flexibles Protein verschiedene Bindestellen für zelluläre Proteine, welche die Aktivität des p53-Proteins regulieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung einer Vielzahl von p53-Interaktionspartnern auf der Grundlage MS-basierter proteomischer Studien. Unter diesen Interaktionspartnern befand sich auch eine Anzahl molekularer Chaperone (Abbildung 3.4 C).

Prolin-Isomerasen sind in verschiedene zelluläre Prozesse, wie Proteinfaltung, -transport und -assemblierung, Signaltransduktion und Zellzyklus-Regulation, involviert (Göthel, 1999) und stellen aufgrund dessen ein wichtiges Element zur Regulierung zellulärer Schlüsselproteine, wie beispielsweise p53, dar. Mögliche „Substrate“ dieser Faltungshelfer sind naturgemäß Proteinregionen mit Prolin-Bausteinen. Das p53-Protein weist eine N-terminale Prolin-reiche Region auf, die interessanterweise eine der am wenigsten erforschten Bereiche des p53 ist, obgleich ihr eine Involvierung in p53-vermittelte Prozesse, wie beispielsweise Apoptose und Transkription, zugeschrieben wird (Zhu, 1999 und Toledo, 2007).

Die Aminosäure Prolin ist von bedeutendem Einfluss in der Festlegung der Proteinstruktur, da sie in *cis*- oder *trans*-Konformation existieren und „Knicke“ in Polypeptidketten einführen kann. Die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen ist der Zeit-limitierende Schritt in der Proteinfaltung (Grathwohl, 1981). Die Bedeutung der Enzym-katalysierten Prolyl-*cis/trans* Isomerisierung als ein wichtiger regulatorischer Mechanismus in der Physiologie und Pathologie des Menschen wurde mit Entdeckung der Phosphorylierungs-spezifischen Prolyl-Isomerase Pin1 bekannt (Lu, 1996). Neuere Studien zeigen, dass sowohl die Phosphorylierungs-abhängige, als auch die Phosphorylierungs-unabhängige Prolyl-*cis/trans* Isomerisierung als molekularer Schalter agieren kann, um den Umfang und die Dauer eines zellulären Prozesses zu kontrollieren. Die Prolyl-*cis/trans* Isomerisierung tritt als kritische Komponente verschiedener Signalkaskaden innerhalb der Zelle auf und stellt somit ein interessantes Ziel für therapeutische Ansätze dar. Zusätzlich zur Funktion eines molekularen Schalters, der es einem Protein ermöglicht, funktionell distinkte Zustände einzunehmen, dient die Prolin-Isomerisierung auch als Erkennungselement für verschiedene Peptidyl-prolyl Isomerasen (PPIasen). Die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen resultiert in Konformationsänderungen der beteiligten Proteine bis hin zum gleichzeitigen Vorliegen verschieden gefalteter stabiler Subspezies. Diese Veränderungen innerhalb der Proteinstruktur können wiederum das Transaktivierungspotential, die Proteinstabilität und die intrazelluläre Lokalisierung der betreffenden Proteine beeinflussen (Shaw, 2007).

Ein Beispiel hierfür ist der Einfluss der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18, auch Cyclophilin A genannt, in der Vermittlung der Funktion der T-Zell-spezifischen Tyrosinkinase Itk während der T-Zell-Rezeptor-Bindung (Lu, 2007 und

Min, 2005). Ferner bindet Cyp 18 an das Gag-Polypolprotein des HIV-1 und ist essentiell für dessen Infektiosität (Luban, 1993). Zusammen mit Hsp 90, einem Mitglied der Chaperon-Familie, binden und aktivieren Cyclophiline und FK506-Bindeproteine (FKBP) Steroidrezeptoren (Pratt, 1997). Neben den Cyclophilinen und den FKBP existiert eine dritte Klasse von Prolyl-Isomerasen, die Parvuline. Das humane Parvulin-Homologe Pin1 ist als mitotischer Regulator essentiell für den G2/M-Übergang des eukaryotischen Zellzyklus (Lu, 1996). DNA-Schäden induzieren die Phosphorylierung des p53 an Ser/Thr-Pro Motiven. Diese fördern wiederum die Bindung von Pin1 an p53. Die Interaktion des Pin1 mit p53 stimuliert dessen DNA-Bindeaktivität und die transaktivierende Funktion des Tumorsuppressors (Zheng, 2002).

Das Prinzip intrinsisch flexibler oder teilweise unstrukturierter Proteine korreliert mit der Bindungsdiversität und der Potenzierung von Protein-Protein-Interaktionen. Proteine mit unstrukturierten Regionen weisen oft funktionelle Vorteile auf (Wright, 1999). Somit ist die strukturelle Flexibilität möglicherweise die Grundvoraussetzung des Tumorsuppressorproteins p53 zur Vernetzung einer Vielzahl verschiedener Signale in der Entscheidung zwischen Zellteilung und Apoptose. Aufgrund dessen erfolgt die Aktivierung und Inaktivierung des p53 potentiell über die Induktion von Konformationsänderungen innerhalb des Proteins, ausgelöst durch molekulare Faltungshelfer-Proteine, wie beispielsweise Cyclophilin 18, welche möglicherweise die Interaktion mit weiteren zellulären Faktoren, die DNA-Bindefähigkeit und seine transaktivierende Funktion modulieren.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher weiterhin die biochemische und funktionelle Charakterisierung der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18. Diese umfasst folgende Punkte im Detail: (i) die Identifizierung der Cyp 18/p53-Interaktion durch Massenspektrometrie, (ii) die Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion in primären Zellen und in humanen, von Tumoren abgeleiteten Zelllinien mit verschiedenem p53-Status, (iii) die Verifizierung der in zellulären Proteinextrakten detektierten p53/Cyp 18-Interaktion unter Verwendung von gereinigten Proteinen zum Nachweis der direkten Interaktion beider Proteine, (iv) die Voraussetzung einer aktiven PPIase für die Interaktion beider Proteine, (v) die Lokalisierung der Cyp 18-Bindestelle in der Prolinreichen Region des p53-Proteins, (vi) der Einfluss der Cyp 18-Bindung auf die Sequenz-spezifische DNA-Bindung des p53 *in vitro* und (vii) die Auswirkungen der

Cyclosporin A-Behandlung von Zellen in Kultur auf die Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit des p53-Proteins und die Expression von p53-Zielgenen.

4.1 Die Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18 interagiert im Zellkern und im Zytoplasma von primären und von Tumoren abgeleiteten Zellen mit p53

Der erste in der Literatur beschriebene Interaktionspartner des p53 ist ein Mitglied der Hsp 70-Chaperon-Familie. Weiterhin wurden Hsp 90 und Hsp 40 als Interaktionspartner des p53 beschrieben. Die Fähigkeit von Hitzeschockproteinen (Hsp), Pharmaka- und Strahlungs-induzierte Apoptose zu inhibieren, deutet auf eine bedeutende Rolle dieser Gruppe von Proteinen in der Überlebensrate von Tumorzellen hin (Pinhasi-Kimhi, 1986; Gordon, 1997 und Mehlen, 1996). Die funktionelle Relevanz der Interaktion von molekularen Chaperonen mit p53 in Tumorzellen ist bisher noch unzureichend aufgeklärt. Möglicherweise ist die anti-apoptotische Wirkung der Hitzeschockproteine mit der Kontrolle der p53-Konformation und der damit verbundenen funktionellen Inaktivierung des p53-Proteins assoziiert (Hupp, 1999). Verschiedene molekulare Chaperone, wie Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60, Hsp 27 und die PPlasen Cyp 18, Cyp 23 und FKBP 25, konnten in den, in dieser Arbeit beschriebenen, proteomischen Interaktionsstudien als zelluläre Interaktionspartner des p53 identifiziert werden (Abschnitt 3.1.2).

Da Cyclophilin 18 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Marks, 1991) und in der Literatur bereits ein Einfluss des Cyclophilin-Inhibitors Cyclosporin A auf p53-vermittelte Prozesse beschrieben wurde (Pyrzynska, 2002), war die Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyp 18 Gegenstand detaillierter Analysen.

Die subzelluläre Lokalisierung des p53 und der PPlase Cyp 18 erfolgte sowohl im Nukleus als auch in Zytoplasma unabhängig vom p53-Status (Wt und mut p53-Form) und dem jeweiligen Ursprung der Zellen (primäre und von Tumoren abgeleitete Zellen) (Abbildung 3.2. und Abbildung 3.5). Die Formierung des p53/Cyp 18-Komplexes wurde mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation in nuklearen und zytoplasmatischen Proteinfractionen ungestresster Zellen (Abbildung 3.11) und unter Verwendung gereinigter rekombinanter Proteine (Abbildung 3.9) bewiesen. Dies deutet auf einen direkten Kontakt beider Proteine hin.

Posttranslationale Modifikationen haben Einfluss auf die Stabilität, die Protein-Interaktionen und die Funktion von Proteinen. Das p53-Protein wird hauptsächlich als Antwort auf zellulären Stress post-translational modifiziert (Abschnitt 1.3.2.1). In dieser Arbeit konnten bisher noch nicht in der Literatur beschriebene posttranslationale Modifikationen sowohl am p53-Protein als auch am Cyp 18-Protein mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie detektiert werden. Dabei handelt es sich am p53-Protein um die phosphorylierten Aminosäurereste Ser¹⁶⁶ und Thr¹⁷⁰, die in der zentralen DNA-Bindedomäne lokalisiert sind (Abbildung 3.6). Der Einfluss dieser Phosphorylierungsstellen auf die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung des p53-Proteins ist potentiell Gegenstand zukünftiger Studien.

Mit Hilfe der 2D-Elektrophorese wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Cyp 18-Isoformen, die sich hinsichtlich ihres isoelektrischen Punkts unterscheiden, in humanen Tumorzelllinien detektiert (Abbildung 3.7). Im Zusammenhang mit der Infektiosität des HIV-Typ1 wurden bereits Cyp 18-Isoformen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten (pI: 6.88, 6.53 und 6.40) beschrieben. Die Cyp 18_{6.88}-Isoform spielt möglicherweise eine kritische Rolle bei der Anhaftung des Virus an die Oberfläche der Zielzelle und die Isoformen Cyp 18_{6.40} und Cyp 18_{6.53} regulieren die Konformation des HIV-1 Kapsid-Proteins (Misumi, 2002). Des Weiteren existieren mehrere Cyclophilin-Isoformen in humanen epidermalen Zellen, deren Expression mit der Differenzierung humaner Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* korreliert (Chatellard-Gruaz, 1994). Am Cyclophilin 18 wurden bisher zwei Phosphorylierungsstellen (Ser¹⁵ und Thr¹⁵⁷) und zwei Acetylierungsstellen (Val² und Lys¹²⁵) detektiert (<http://www.uniprot.org/uniprot/P62937>). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung von zwei weiteren Acetylierungsstellen am Lys²⁸ und Lys⁴⁴ des Cyp 18-Proteins mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie (Abbildung 3.8). Die in ihren isoelektrischen Punkten verschiedenen Cyp 18-Isoformen, sind möglicherweise auf Cyp 18-Subspezies mit unterschiedlichen posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Acetylierungen, zurückzuführen. Der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen des Cyclophilin 18 auf dessen Funktion und die Interaktion mit weiteren Proteinen ist bisher noch unzureichend aufgeklärt. Ferner bleibt zu überprüfen, inwiefern die in dieser Arbeit detektierten posttranslationalen Modifikationen des p53 und des Cyp 18 deren Interaktion direkt beeinflussen.

4.2 Die Interaktion des p53 mit Cyp 18 setzt eine aktive PPlase voraus

Prolyl-Isomerasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen in Oligopeptiden mit hoher Effizienz (Fischer, 1984) und beschleunigen die langsamen, Prolin-limitierten Schritte in der Faltung zahlreicher zellulärer Proteine. Cyclophilin wurde 1984 aufgrund seiner hohen Affinität für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) identifiziert (Handschuhmacher, 1984). CsA bindet an Cyclophiline und inhibiert deren PPlase-Aktivität, wobei sich die Inhibitionskonstanten im nanomolaren Bereich befinden (Fischer, 1989 und Kofron, 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart des Cyclophilin 18-Inhibitors Cyclosporin A die Cyp 18/p53-Komplexbildung verhindert (Abbildung 3.10 A). Zudem war eine Cyp 18-Variante (Q72T) mit einer Mutation im aktiven Zentrum nicht in der Lage p53 zu binden (Abbildung 3.10 B). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass das aktive Zentrum des Cyp 18-Enzyms in die p53-Bindung involviert ist und p53 somit ein potentielles Substrat für die PPlase-Aktivität des Cyp 18 darstellt.

4.3 Die Bindestelle des Cyp 18 ist in der Prolin-reichen Region des p53-Proteins lokalisiert

Die Prolin-reiche Domäne umfasst die Aminosäuren 62 bis 92 im N-terminalen Bereich des p53-Proteins (Walker, 1996). Verschiedene Proteine, wie beispielsweise mSin3a, iASSP und die PPlase Pin1, binden diese p53-Region und modulieren die Funktionen des p53-Proteins (Zilfou, 2001; Wulf, 2002 und Bergamaschi, 2006). Zudem ist die Prolin-reiche p53-Region bedeutend für die Bcl-XI-Interaktion und die Bax-Aktivierung (Chipuk, 2004 und Xu, 2006).

Die Bindestelle des Cyp 18 am p53-Protein konnte zunächst durch Interaktionsstudien mit rekombinantem Cyp 18 und einem N-terminalen p53-Fragment (AS 1-81) auf die N-terminale Region des p53 eingegrenzt werden (Abbildung 3.12 A). Da die Prolin-reiche Region des p53 aufgrund des Vorhandenseins von fünf PXXP-Motiven ein potentielles Ziel für die PPlase-Funktion des Cyp 18 darstellt, lag dieser p53-Bereich im Fokus weiterer Studien. Die p53/Cyp 18-Interaktion konnte mit Hilfe eines p53-Peptids (p53⁶⁸⁻⁸¹), das die Prolin-reiche Region von AS 68 bis AS 81 des p53 repräsentiert, erfolgreich inhibiert

werden (Abbildung 3.12 B). Die Fokussierung auf die Prolin-reiche p53-Region als potentieller Interaktionsbereich der PPlase Cyp 18 hat sich durch die Tatsache, dass die p53-Variante mit einem Prolin an der Stelle 72 eine stärkere Interaktion mit Cyp 18 zeigte als die p53-Variante mit einem Arginin an der Stelle 72, als zutreffend erwiesen (Abbildung 3.12 D).

Der Aminosäureaustausch (Arg/Pro) an der Position 72 des p53-Proteins ist eine natürlich vorkommende Sequenzvariation (Polymorphismus) dieses Proteins. Die 72P-Variante des p53 wird vorzugsweise bei Menschen exprimiert, die in äquatorialen Bereichen leben. Im Gegensatz dazu kommt die 72R-Variante vermehrt bei Menschen nördlicherer und südlicherer Breiten vor (Beckman, 1994). Die Tatsache, dass die 72R-Variante schneller im SDS-Gel läuft als die 72P-Variante, lässt auf strukturelle Unterschiede beider p53-Varianten schließen (Harris, 1986). Zudem weisen die jeweiligen Polymorphismus-Varianten (Arg/Pro) des p53 Unterschiede in der Funktion auf. Die 72R-Variante ist im Vergleich zur 72P-Variante ein besserer Apoptose-Induktor (Dumont, 2003 und Pietsch, 2006). Die 72P-Variante hingegen ist ein wirksamerer Transkriptionsaktivator, besitzt ein stärker ausgeprägtes Vermögen Zellzyklusarrest zu induzieren und ist effizienter in der DNA-Reparatur (Thomas, 1999; Pim, 2004 und Siddique, 2006). Das iASSP-Protein bindet vorzugsweise die 72P-Variante und inhibiert deren Aktivität. Dies lässt als mechanistische Schlussfolgerung eine effektivere Apoptose-Induktion der p53^{72R}-Variante zu (Bergamaschi, 2006).

Der Aminosäurebereich 64 bis 81 der Prolin-reichen Region des p53 weist ferner Sequenzhomologie mit den AS 213-231 eines Kapsidproteins des HIV-1 auf (Abbildung 4.2 A), dessen Interaktion mit Cyclophilin 18 bereits strukturell aufgeklärt ist (Gamble, 1996). Auf der Grundlage der bisher vorliegenden strukturellen Daten wurde ein molekulares Modell der p53/Cyp 18-Interaktion erstellt (Abbildung 4.2). Um die strukturellen Gegebenheiten des hier vorgeschlagenen Cyp 18-Bindemotivs, des p53-Bereichs AS 68 bis AS 81, festzulegen, wurde die Modellierung des p53/Cyp 18-Komplexes unter Zuhilfenahme von Strukturinformationen der RCSB-Protein-Datenbank (PDB: 1ak4) durchgeführt.

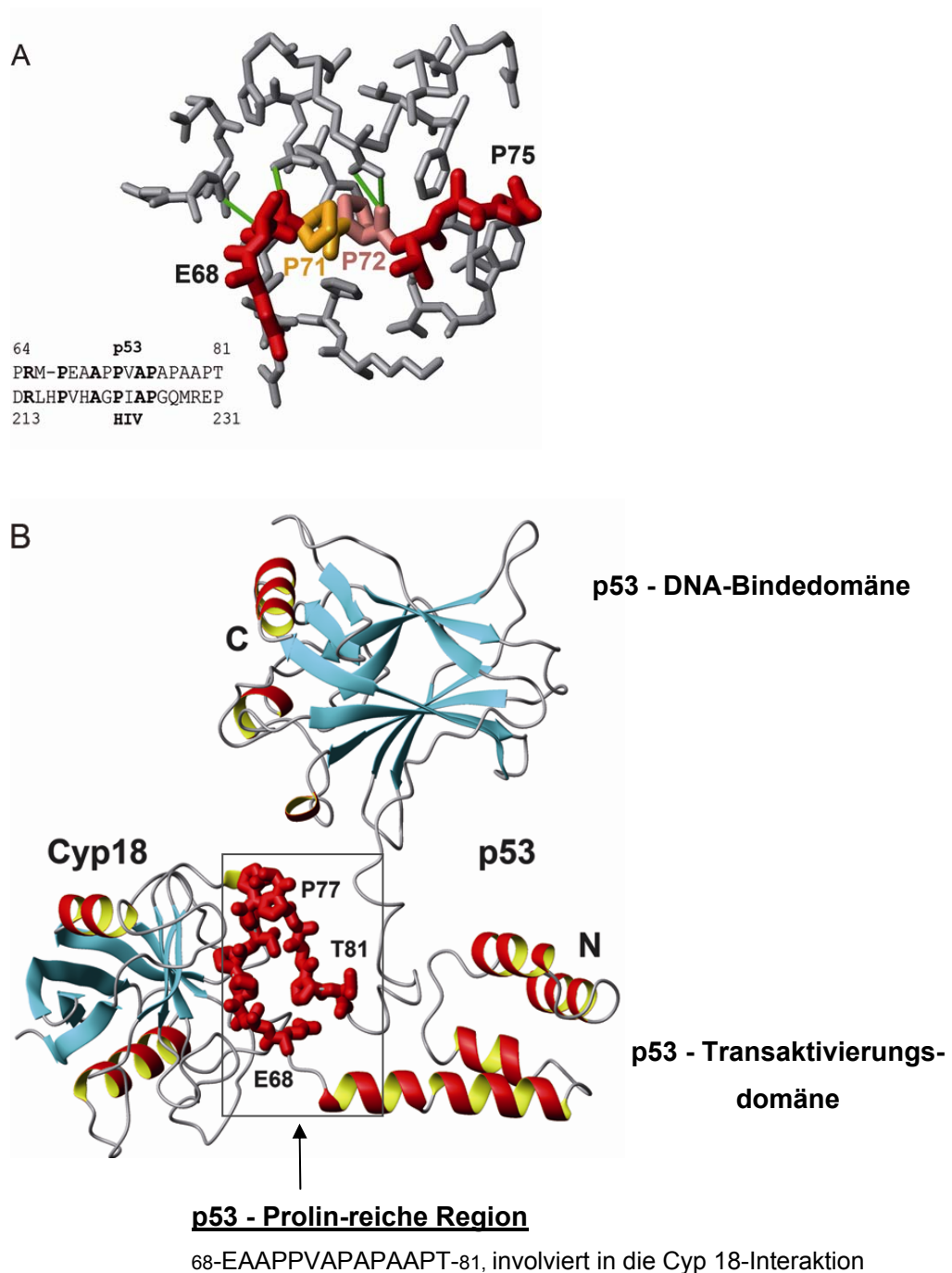


Abbildung 4.2: Molekulares Modell der p53/Cyp 18-Interaktion

A: Gezeigt sind die schweren Atome des Cyp 18 (grau) und die Aminosäuren Glu68 bis Pro75 des p53-Proteins (rot/orange). Die Wasserstoffbrücken sind in Grün dargestellt. **B:** Domänen-Ansicht: die α -Helizes sind durch ein rot/oranges Band und die β -Faltblätter in Cyan dargestellt. Die Schweratome der AS-Reste des p53 (E68-T81), die an der Interaktion mit Cyp 18 beteiligt sind, sind in Rot dargestellt (erstellt durch Dr. O.Ohlenschläger, NMR-Group, FLI-Jena; Quelle: Baum, 2009).

Nach diesem molekularen Modell der p53/Cyp 18-Interaktion bilden die Aminosäuren 68 bis 81 der Prolin-reichen p53-Domäne, für die bisher in der Literatur noch keine Struktur beschrieben ist, einen Loop aus (Abbildung 4.2 B), der sich mit den AS 68-

75 in das aktive Zentrum des Cyp 18-Enzyms einpasst (Abbildung 4.2 A). Diese Konformation würde durch 4 Wasserstoffbrückenbindungen ähnlich effizient stabilisiert, wie es im HIV-Kapsid-Komplex zu beobachten ist (Molekulares Modell erstellt durch Dr. O.Ohlenschläger, NMR-Group, FLI-Jena; Quelle: Baum, 2009).

4.4 Cyclophilin 18 inhibiert die Sequenz-spezifische DNA-Bindung des p53 *in vitro*

In der Literatur sind verschiedene Hinweise auf einen Einfluss der Prolin-reichen Region des p53-Proteins auf dessen DNA-Bindung zu finden. Beispielsweise ist die Fähigkeit des p53 zur Sequenz-spezifischen Transaktivierung des PIG3-Promotors bei einer p53-Variante mit fehlender Prolin-reicher Region beeinträchtigt (Venot, 1998). Das Pin1-Protein ist die einzige Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase, die bisher in der Literatur als Bindeprotein für p53 beschrieben ist (Wulf, 2002). Die Bindung der PPlase Pin1 an die Prolin-reiche Region des p53 als Antwort auf genotoxischen Stress weist einen positiven Effekt auf die DNA-Bindeaktivität und die transaktivierende Funktion des p53 auf (Zheng, 2002). Dies legt nahe, dass die Prolin-reiche Region durch konformationelle Umlagerungen die Funktion der zentralen Domäne des p53-Proteins modulieren kann und somit Einfluss auf die Sequenz-spezifische DNA-Bindung des p53 ausübt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Bandshift-Experimenten gezeigt werden, dass die PPlase Cyp 18 die Fähigkeit des p53-Proteins, *in vitro* an die p53-Konsensus-Sequenz 5'-TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGG-3' des humanen *GADD45*-Promotors zu binden, inhibiert. Eine funktionell inaktive Cyp 18-Variante (Q62T), die eine Mutation im aktiven Zentrum aufweist, zeigte hingegen keine Beeinflussung der p53/DNA-Bindung *in vitro* (Abbildung 3.13). Dies stützt die Annahme einer Modulation der DNA-Bindefähigkeit des p53 resultierend aus einer Konformationsänderung innerhalb des p53-Proteins, ausgelöst durch die Cyp 18-Interaktion. Die hier propagierten strukturellen Veränderungen des p53-Proteins aufgrund der Cyp18-Bindung bedürfen weiterer experimenteller Abklärungen, beispielsweise durch NMR-basierte Strukturanalysen.

Die Interaktion des p53 mit der PPlase Cyp 18 hat somit potentiell eine negative Regulation der transaktivierenden Funktion des p53 zur Folge. Aufgrund der Tatsache, dass das Pin1-Protein die DNA-Bindung und die transaktivierende Funktion des p53 verstärkt, wäre eine weitere Aufklärung einer möglichen

Konkurrenz beziehungsweise Synergie der beiden PPlasen Pin1 und Cyp 18 von wissenschaftlichem Interesse.

4.5 Cyclosporin A-Behandlung ändert die Zellzyklusverteilung p53-abhängig und beeinflusst die p53-Zielgen-Expression

Der Cyclophilin 18-Inhibitor Cyclosporin A wird Patienten nach Organtransplantationen als Immunsuppressivum verabreicht. Diese Patienten entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 20% UV-induzierten Hautkrebs. Einer möglichen funktionellen Wechselwirkung von p53 und Cyp 18 kann daher sogar medizinische Bedeutung zukommen. Ferner wurde ein direkter Dosis-abhängiger toxischer Einfluss von Cyclosporin A auf renale proximale tubuläre Zellen, charakterisiert durch reduzierte DNA-Synthese, Zellzyklus-Blockade und die Induktion Fas-vermittelter Apoptose, festgestellt (Healy, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei hinsichtlich des p53-Status verschiedene H1299-Zelllinien (H1299/p53^{-/-}, H1299/p53^{72P} und H1299/p53^{72R}), nach Behandlung mit Cyclosporin A, p53-abhängig in der G2/M-Phase akkumulieren, wobei dieser Effekt bei Zellen, welche die p53^{72P}-Variante enthalten, am stärksten ausgeprägt ist (Abbildung 3.14 A). Eine Involvierung des p53-Proteins in Prozesse, die den G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunkt regulieren ist bereits beschrieben (Agarwal, 1995 und Taylor, 2001).

Der Prolin-Isomerisierung der p53-Transaktivierungsdomäne wird eine zentrale Rolle in der Koordination der Kinase-Signalwege, die an der Formation des p53-Transkriptionskomplexes beteiligt sind, zugeschrieben (Hupp, 2007). Ein Beispiel für die Funktion des p53-Proteins als Transkriptionsfaktor ist die positive Regulation der Expression des Mdm2-Gens (Michael, 2002). Das Proteinniveau des Mdm2 ist nach moderatem Stress erhöht, nach schwerwiegender DNA-Schädigung hingegen reduziert (Rinaldo, 2007). Bei embryonalen Mausfibroblasten wurde nach Behandlung der Zellen mit Cyclosporin A eine p53-abhängige Erhöhung der Expression des p53-Zielgens *Mdm2* beobachtet (Pyrzynska, 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit resultierte eine Cyclosporin A-Behandlung humaner Zellen in einer p53-abhängigen Erhöhung der Mdm2-Expression (Abbildung 3.15). Dabei zeigte die p53-Variante mit dem Prolin an der Stelle 72 eine stärkere Transkriptionsaktivierung des *Mdm2*-Gens im Vergleich zur Arginin-72 p53-Variante. Somit führt die kurzzeitige Behandlung der Zellen mit geringen Mengen Cyclosporin

A, welche im Bereich klinischer Applikationsdosen liegen, zu einer Aktivierung des p53-Proteins. Diese Aktivierung ist unabhängig von einer Ser-15-Phosphorylierung und hat eine p53-abhängige Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase und eine verstärkte Expression des p53-Zielgens *Mdm2* zur Folge. Gegenwärtig ist noch unzureichend geklärt, weshalb eine p53-Form die keine Prolin-reiche Region besitzt, das Mdm2-Protein mit höherer Affinität bindet als die Wt p53-Form. Die Prolin-reiche Region ist möglicherweise direkt oder indirekt in die Mdm2-Bindung involviert. Diese Region dient eventuell als Anker für einen dritten Bindepartner, möglicherweise durch Cyp 18 repräsentiert, der die Interaktion von p53 und Mdm2 moduliert. In Abwesenheit der Polyprolin-Region wäre der mutmaßliche Bindepartner nicht in der Lage p53 zu binden und infolgedessen nicht fähig die Bindung von p53 und Mdm2 zu modulieren (Berger, 2001).

4.6 Ausblick

Nierentransplantat-Patienten zeigen aufgrund immunsuppressiver Behandlung mit Cyclosporin A eine verringerte Fähigkeit zur DNA-Reparatur und ein vermehrtes Auftreten von Krebs im Vergleich zu gesunden Probanden (Herman, 2000). Charakteristisch für diese Patienten ist ein verstärktes Auftreten von Hautkrebs, speziell Plattenepithelkarzinomen, malignen Melanomen und Kaposi-Sarkomen (Jensen, 1999). Etwa 10% der mit Cyclosporin A behandelten Patienten entwickeln Hauttumore und Lymphome 70 Monate nach der Organtransplantation. Patienten mit Herztransplantationen erhalten die intensivste Immunsuppression und sind aufgrund dessen besonders anfällig für Krebsentstehung. Nach 5 Jahren entwickeln 17% dieser Patienten durchschnittlich zwei Hauttumore pro Person. Wiederum 70% dieser Tumore sind in der Sonne ausgesetzten Bereichen der Haut lokalisiert. Plattenepithelkarzinome, welche durch UV induziert werden, sind am markantesten bei immunsupprimierten Patienten (Weischer, 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengestellten Befunde lassen eine klinische Relevanz der p53/Cyp 18-Interaktion vermuten. Das durch eine Cyclosporin A-Behandlung erhöhte Mdm2-Proteinniveau der Zelle zieht potentiell eine Inhibierung der transkriptionellen Aktivität des p53 nach sich. Somit käme es zur Inhibierung der p53-abhängigen Expression von DNA-Reparaturgenen nach UV-induzierter DNA-Schädigung. Die hätte wiederum die Akkumulation von Schäden in der DNA und somit ein verhöhtes Risiko der Entstehung von Tumoren zur Folge.

Die p53-abhängige Apoptose tritt verstärkt in Cyp 18-defizienten Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu Cyp 18-profizienten Zellen auf. Die Expression des p53-Zielgens *Fas* ist bei Induzierung p53-abhängiger Apoptose in Abwesenheit des Cyp 18 erhöht (Baum, 2009). Dies lässt darauf schließen, dass Cyp 18 die proapoptotische Fähigkeit des p53-Proteins unterdrückt. Dies würde eine Erklärung für die erhöhte Expression von Cyp 18 in Tumoren darstellen (Campa, 2003). Das p53-Prolin-72-Allel zeigt zudem einen Nachteil im Überleben von Krebszellen in hypoxischer Umgebung. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die begünstigte Retention des Arginin-Allels in Tumorgewebe *in vitro* dar (Sansone, 2007). Auch würde die Transkriptions-aktivierende Funktion der p53^{72P}-Variante durch dessen verstärkte Bindung an das in Krebszellen vermehrt exprimierte Cyp 18 stärker unterdrückt, als die der p53^{72R}-Variante, die Cyp 18 schwächer bindet. Die anormale Expression von Cyclophilinen könnte, aufgrund ihrer Funktion als molekulare Faltungshelfer, die Krebszellen mit der Möglichkeit ausstatten, die Eigenschaften verschiedener zellulärer Schlüsselproteine, z.B. Transkriptionsfaktoren und zelluläre Signalmoleküle wie p53, zu verändern. Infolgedessen würden die veränderten Expressionsraten der Cyclophiline zum Verlust der Kontrolle über das Zellwachstum und zu inhibitorischen Effekten auf die Apoptose führen.

Eine detaillierte Analyse der molekularen Gegebenheiten, die bei mit Cyclosporin A behandelten Patienten zur Krebsentstehung führt, ist somit dringend notwendig. Eine Untersuchung eines Einflusses des polymorphen Status (Arg/Pro) des p53 an der AS-Stelle 72 auf die Tumorraten der mit Cyclosporin A behandelten Patienten wäre zudem von medizinischem Interesse. Nicht zuletzt bleibt eine potentielle Involvierung gestörter p53-vermittelter Prozesse, wie beispielsweise die p53-abhängige Transaktivierung von DNA-Reparaturgenen, zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 fungiert als Stress-aktivierter Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen, die in die Wachstumskontrolle involviert sind, reguliert. Multiple Signalwege, wie beispielsweise die DNA-Schadensantwort, die Zellzykluskontrolle und die Induktion der Apoptose, werden durch p53 kontrolliert. Das p53-Protein ist ein Tetramer und beinhaltet verschiedene Bindestellen für zelluläre Proteine, welche die Aktivität des p53-Proteins regulieren. Da p53 ein instabiles und konformationell flexibles Protein ist, wird dessen Aktivierung und Inaktivierung voraussichtlich durch die Induktion von Änderungen in der Protein-Konformation reguliert. Die Funktion einer Prolin-reichen Domäne im N-Terminus der p53-Sequenz ist bisher noch unzureichend aufgeklärt, obgleich ihr ein Einfluss auf die Funktion des p53 als Transkriptionsaktivator und in der DNA-Schadensantwort zugeschrieben wird. Molekulare Faltungshelfer repräsentieren ein wichtiges Element in der Regulation des aktiven Pools an p53. Cyclophiline sind Proteine, die Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase-Aktivität besitzen, welche essentiell für die Proteinfaltung *in vivo* ist, und spielen eine Rolle in der Regulation der Transkription und Differenzierung. Die funktionelle Wechselwirkung zwischen p53 und Cyclophilin 18 (Cyp 18) ist potentiell von medizinischem Interesse, da der Cyclophilin 18-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) Patienten nach Organtransplantationen in großem Umfang verabreicht wird. Bedauerlicherweise entwickeln 10-20% der mit CsA behandelten Patienten Hautkrebs aufgrund bisher noch nicht bekannter Umstände.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 physikalisch und funktionell mit Cyp 18 interagiert. Diese Interaktion benötigt das katalytisch aktive Zentrum des Cyp 18-Proteins und reduziert die Sequenz-spezifische DNA-Bindung des p53. Cyp 18 bindet vorzugsweise an die Prolin-reiche Region des p53, da: (i) ein synthetisches Peptid der Aminosäuren 68-81 des p53 die Interaktion inhibiert; (ii) molekulares Docking die betreffende p53-Sequenz in das aktive Zentrum des Cyp 18-Proteins einpasst; (iii) eine p53-Variante mit einem Prolin-Rest an der Position 72 (p53^{72P}), die in äquatorialen Regionen weit verbreitet ist, mit Cyp 18 effektiver interagiert als die korrespondierende p53^{72R}-Variante. Die Beeinträchtigung der p53/Cyp 18-Interaktion, durch den Zusatz von CsA zu p53-exprimierenden Zellen in Kultur, induziert eine Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase. Dieser Effekt ist ausgeprägter bei Zellen, die die p53^{72P}-Variante exprimieren, im Vergleich zu p53^{72R}-exprimierenden Zellen, in einem ansonsten isogenen zellulären Hintergrund. Darüber hinaus wird die Expression p53-abhängiger Genexpression, beispielsweise *Mdm2*, durch die Verabreichung von CsA beeinflusst. Die aus dieser Arbeit resultierenden funktionellen Daten lassen auf eine klinische Relevanz der p53/Cyp 18-Interaktion schließen.

6 Abstract

The tumor suppressor p53 acts as a stress activated transcription factor that directs the expression of genes involved in growth control. A number of signaling pathways are controlled by p53, including DNA damage response, cell cycle control and induction of apoptosis. The p53 protein is tetrameric and contains several binding sites for cellular proteins that regulate p53 activity. p53 is an instable and conformationally flexible protein. Molecular chaperones represent an important element for regulating the pool of active p53. The proline-rich domain in its N-terminal region is one of the least understood domains of p53 though it is known to be required for p53-dependent transcriptional and DNA-damage responses. Cyclophilins are proteins which exhibit PPIase activity essential for protein folding *in vivo*, and play a role in regulation of transcription and differentiation. The functional interplay between these two proteins may be of medical importance since the cyclophilin 18-inhibitor Cyclosporin A (CsA) is widely prescribed to patients after organ transplantations. Unfortunately, 10-20% of CsA-treated patients develop skin cancer for hitherto unknown reasons. The cellular target for CsA is the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase cyclophilin 18 (Cyp 18). Here we show that the tumor suppressor protein p53 physically and functionally interacts with Cyp 18. This interaction requires the active site of Cyp 18 and reduces the sequence specific DNA binding of p53. Cyp 18 preferably binds to the proline-rich region of p53, since: (i) a synthetic peptide comprising amino acids 68-81 of p53 inhibited this interaction, (ii) the respective p53 sequence fitted into the Cyp 18 active site by molecular docking and (iii) a p53 variant containing a proline residue at position 72 (p53^{P72}), which is widespread in equatorial regions, interacted with Cyp 18 more effectively than the corresponding p53^{R72} variant. Impairment of the Cyp 18/p53 interaction by admitting CsA to p53-expressing culture cells induced a G2/M-phase arrest that was more pronounced when p53^{P72} rather than p53^{R72} was expressed in an otherwise isogenic cellular background. Also, p53-dependent apoptosis was elevated in Cyp 18 knockout cells, suggesting an antiapoptotic potential of Cyp 18/p53 complexes. Moreover, the expression of p53-dependent genes, like Mdm2, was influenced by the administration of CsA. Our functional data suggest a clinical relevance of the p53/Cyp 18 interaction observed.

7 Literaturverzeichnis

- Adimoolam S, Ford JM (2002) p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *PNAS* **99** (20): 12985-12990
- Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8493-8497
- Agrawal RS, Agrawal YP, Mäntyjärvi RA (1994) Flow Cytometric Quantitation of C-myc and p53 Proteins in Bovine Papillomavirus Type 1-Transformed Primary Mouse Fibroblasts. *Cytometry* **17**: 237-245
- Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Iravani M, Ashworth A, Silva A (2006) p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO* **7** (2): 219-224
- Asher G, Lotem J, Kama R, Sachs L, Shaul Y (2002) NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *PNAS* **99** (5): 3099-3104
- Bai L, Zhu WG (2006) p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J.Cancer Mol.* **2** (4): 141-153
- Balducci L, Ershler WB (2005) Cancer and aging: a nexus at several levels. *Nat. Rev.* **5** (8): 655-662
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya L, Anderson CW, Chessa L, Smorodinski NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281** (5383): 1674-1677
- Baum N, Schiene-Fischer C, Frost M, Schumann M, Sabapathy K, Ohlenschläger O, Grosse F, Schlott B (2009) The prolyl cis/trans isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis. *Oncogene* **28** (44): 3915-3925
- Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection. *Hum Hered* **44** (5): 266-270
- Bell S, Klein C, Müller L, Hansen S, Buchner J (2002) p53 contains large unstructured regions in its native state. *J. Mol. Biol.* **322** (5): 917-927
- Bensaad K, Vousden KH (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* **17** (6): 286-291
- Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X (2006) iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat. Genet.* **38** (10): 1133-1141
- Berger M, Vogt Sionov R, Levine AJ, Haupt Y (2001) A role of the polyproline domain of p53 in its regulation by Mdm2. *J Biol Chem* **276** (6): 3785-3790
- Berger M, Stahl N, Del Sal G, Haupt Y (2005) Mutations in proline 82 of p53 impair its activation by Pin1 and Chk2 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* **25** (13): 5380-5388
- Bonafe M, Salvioli S, Barbi C, Trapassi C, Tocco F, Storci G, Invidia L, Vannini I, Rossi M, Marzi E, Mishto M, Capri M, Olivieri F, Antonicelli R, Memo M, Uberti D, Nacmias B, Sorbi S, Monti D, Franceschi C (2004) The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischemia-induced cell death. *Cell Death Differ.* **11** (9): 962-973

- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Campa MJ, Wang MZ, Howard B, Fitzgerald MC, Patz EF Jr (2003) Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **63** (7): 1652-1660
- Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* **23** (8): 1514-1521
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281** (5383): 1677-1679
- Capano M, Virji S, Crompton M (2002) Cyclophilin-A is involved in excitotoxin-induced caspase activation in rat neuronal B50 cells. *Biochem. J.* **363** (Pt 1): 29-36
- Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, Gariboldi M, Myers TG, Weinstein JN, Pommier Y, Fornace AJ (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **19** (3): 1673-1685
- Champoux JJ (2001) DNA Topoisomerases: Structure, Function and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 369-413
- Chatellard-Gruaz D, Saurat JH, Siegenthaler G (1994) Differential expression of cyclophilin isoforms during keratinocyte differentiation. *Biochem. J.* **303**: 863-867
- Chen J, Sadowski I (2005) Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH 1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *PNAS* **102** (13): 4813-4818
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303** (5660): 1010-1014
- Craig EA, Gambil BD, Nelson RJ (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57** (2): 402-414
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126** (1): 121-134
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426** (6963): 194-198
- Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK, Dotto GP (1998) Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280** (5366): 1069-1072
- Dimri GP (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* **7** (6): 505-512
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* **356** (6366): 215-221
- Dornan D, Eckert M, Wallace M, Shimizu H, Ramsay E, Hupp TR, Ball KL (2004) Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol. Cell. Biol.* **24** (22): 10083-10098
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* **33** (3): 357-365

- Fischer G, Bang H, Mech H (1984) Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* **43** (10): 1101-1111
- Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**: 476-478
- Fischer G, Aumüller T (2003) Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **148**: 105-150
- Fitch ME, Cross IV, Ford JM (2003) p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. *Carcinogenesis* **24** (5): 843-850
- Franke EK, Yuan HE, Luban J (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372** (6504): 359-362
- Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP (1996) Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87** (7): 1285-1294.
- Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R (2007) Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8** (8): 645-654
- Golubovskaya VM, Finch R, Zheng M, Kurenova EV, Cance WG (2008) The 7-amino-acid site in the proline-rich region of the N-terminal domain of p53 is involved in the interaction with FAK and is critical for p53 functioning. *Biochem J.* **411** (1): 151-160
- Gordon SA, Hoffman RA, Simmons RL, Ford HR (1997) Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis. *Arch Surg.* **132** (12): 1277-82
- Görg A, Postel W, Günther S, Weser J (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* **6** (12): 599-604
- Göthel SF, Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* **55** (3): 423-436
- Grathwohl C, Wuthrich K (1981) Nmr studies of the rates of proline cis-trans isomerisation in oligopeptides. *Biopolymers* **20**: 2623-2633
- Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458** (7242): 1127-1130
- Handschuhmacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for Cyclosporin A. *Science* **226** (4674): 544-547
- Harms K, Nozell S, Chen X (2004) The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **61** (7-8): 822-842
- Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V (1986) Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol.* **6** (12): 4650-4656
- Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24** (17): 2899-2908
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299
- Healy E, Dempey M, Lally C, Ryan P (1998) Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney International* **54**: 1955-1966

- Helton ES, Chen X (2007) p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry* **100** (4): 883-896
- Herman M, Weinstein T, Korzets A, Chagnac A, Ori Y, Zevin D, Malachi T, Gafer U (2000) Effect of cyclosporin A on DNA repair in kidney transplant recipients. *J Lab Clin Med* **137** (1): 14-20
- Hermeking H, Benzinger A (2006) 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.* **16** (3): 183-192
- Hollander MC, Sheik MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, Rosenberg MP, Zhan Q, Fernandez-Salguero PM, Morgan WF, Deng CX, Fornace AJ (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat. Genet.* **23** (2): 176-184
- Howard BA, Furumai R, Campa MJ, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Wang XF, Patz EF (2005) Stable RNA Interference-Mediated suppression of Cyclophilin A diminishes non-small-cell lung Tumor growth in vivo. *Cancer Res.* **65** (19): 8853-8860
- Hupp TR (1999) Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 88-95
- Hupp TR, Walkinshaw M (2007) Multienzyme assembly of a p53 transcription complex. *Nature Structural and molecular Biology* **14** (10): 885-887
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (1999) Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *PNAS* **96** (2): 424-428
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W (1999) Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* **19** (3): 2155-2168
- Jensen P, Hansen S, Møller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, Fauchald P, Simonsen S (1999) Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *Journal of the American Academy of Dermatology* **40**: 177-186
- Jiang M, Axe T, Holgate R, Rubbi CP, Okorokov AL, Mee T, Milner J (2001) p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene* **20** (39): 5449-5458
- Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4** (2): 139-163
- Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* **87**: 789-796
- Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science* **283** (5404): 1001-1004
- Jolly C, Morimoto RI (2000) Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute* **92** (19): 1564-1572
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets Ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology* **18**: 621-663
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71** (4): 587-597
- Kawamoto T, Araki K, Sonoda E, Yamashita YM, Harada K, Kikuchi K, Masutani C, Hanoka F, Nozaki K, Hashimoto N, Takeda S (2005) Dual roles for DNA polymerase η in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* **20** (5): 793-799

- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren W, Shiloh Y, Shkedy D (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *PNAS* **96** (26): 14973-14977
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Human Genetics* **26** (3): 231-243
- Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Colón-Bonilla E, Rich DH (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* **30** (25): 6127-6134
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N Vayssière JL, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB* **9** (13): 1277-1287
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274** (5289): 948-953
- Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem-Biophys. Methods* **10** (3-4): 203-209
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685
- Laiho M, Latonen L (2003) Cell Cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Ann. Med.* **35** (6): 391-397
- Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261-263
- Lane DP (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* **358** (6381):15–16
- Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilisation and activation. *Cell Death and Differentiation* **13** (6): 941–950.
- Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S (2003) Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase promotes p53 degradation. *Cell* **112** (6): 779-791
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome C and dATP dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91** (4): 479-489
- Lilling G, Elena N, Sidi Y, Bakhanashvili M (2003) p53-associated 3'→5' exonuclease activity in nuclear and cytoplasmic compartments of cells. *Oncogene* **22** (2): 233-245
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* **7** (2): 165-171
- Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, Wahl GM (2009) A reversible, p53-dependent G₀/G₁ cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Development* **10**: 934-947
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Cyclosporin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66** (4): 807-815
- Liu G, Chen X (2006) DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. *Mol. Cell. Biol.* **26** (4): 1398-1413

- Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380** (6574): 544-547
- Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK (2007) Prolyl cis-trans isomerisation as a molecular timer. *Nat Chem Biol.* **3** (10): 619-629
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP (1993) Human immunodeficiency virus type I gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73** (6): 1067-1078
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004) Mammalian cell cycle checkpoint: Signalling pathways and their organisation in space and time. *DNA repair (Amst)* **3** (8-9): 997-1007
- Maki CG, Howley PM (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV Radiation. *Molecular and Cellular Biology* **17**(1): 355-363
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* **250** (4985): 1233-1238
- Marks AR (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev.* **76** (3): 631-649
- Marks WH, Harding MW, Handschuhmacher R, Marks C, Lorber MI (1991) The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues. *Transplantation* **52** (2): 340-345
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dhomaie N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Taiko K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* **399** (6737): 700-704
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV (1987) Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.* **7** (2): 961-963
- McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC (2005) Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol. Cell* **20** (5): 783-792
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP (1996) Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **271**: 16510-16514
- Michael D, Oren M (2002) The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12** (1): 53-59
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Moll. Cell* **11** (3): 577-590
- Min L, Fulton DB, Andreotti AH (2005) A case study of proline isomerisation in cell signalling. *Front Biosci* **10**: 385-397
- Misumi S, Fuchigami T, Takamune N, Takahashi I, Takama M, Shoji S (2002) Three Isoforms of Cyclophilin A Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Were Found by Proteomics by Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Virol.* **76** (19): 10000-10008.
- Montague JW, Gaido ML, Frye C (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J. Biol. Chem.* **269** (29): 18877-18880
- Mummenbrauer T, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85** (7): 1089-1099

- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* **250** (10): 4007-21
- O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**: 692-694
- Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T (2000) Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem.* **275** (30): 22627-22630
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat.* **19** (6): 607–614.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* **15** (6): 3032-3040
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 437-496
- Penn I, First MR (1986) Development and incidence of cancer following cyclosporine therapy. *Transplant Proc.* **18**: 210-215
- Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME (2006) Polymorphisms in the p53-pathway. *Oncogene* **25**: 1602-1611
- Pim D, Banks L (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer* **108** (2): 196-199
- Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M (1986) Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature* **320** (6058): 182-184
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18** (3):306-360
- Prives C, Hall PA (1999) The p53 pathway. *The Journal of pathology* **187** (1): 112-126
- Pyrzynska B, Serrano M, Martinez-A C, Kaminska B (2002) Tumor suppressor p53 mediates apoptotic cell death triggered by cyclosporin A. *J Biol Chem.* **277** (16): 14102-14108
- Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S (2007) MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell* **25** (6): 739-750
- Roger L, Gadea G, Roux P (2006) Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell.* **98** (3): 141–152
- Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W, Dornreiter I (2005) A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* **122** (1): 21-32
- Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C, Puisieux A (1996) Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat. Genet.* **14** (4): 482-486
- Ruaro EM, Collavin L, Del Sal G, Haffner R, Oren M, Levine AJ, Schneider C (1997) A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc natl Acad Sci USA* **94** (9): 4675-4680

- Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15** (8): 887-898
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu.Rev.Biochem.* **73**: 39-85
- Sansone P, Storci G, Pandolfi S, Montanaro L, Chieco P, Bonafé M (2007) The p53 codon 72 proline allele is endowed with enhanced cell-death inducine potential in cancer cells exposed to hypoxia. *British Journal of cancer* **96**: 1302-1308
- Scherer SJ, Maier SM, Seifert M, Hanselmann RG, Zang KD, Muller-Hermelink HK, Angel P, Welter C, Scharl M (2000) p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J. Biol. Chem.* **275** (48): 37469-37473
- Schiene C, Fischer G (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current Opinion in structural Biology* **10** (1): 40-45
- Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, Shen JC, Huang LE, Lindor NM, Furuichi Y, Harris CC (2005) Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene* **24** (10): 1738-1748
- Shaulsky G, Ben-Ze'ev A and Rotter V (1990) Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* **5** (11): 1707-1711.
- Shaw PE (2007) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail. *EMBO* **8** (1): 40-45
- Sherry B, Zybarth G, Alfano M, Dubrovsky L, Mitchell R, Rich D, Ulrich P, Bucala R, Cerami A, Bukrinsky M (1998) Role of Cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T-lymphocytes. *PNAS* **95** (4): 1758-1763
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68** (5): 850-858.
- Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JY (2003) Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *PNAS* **100** (5): 2420- 2425
- Siddique M, Balram C, Fiszer-Maliszewska L, Aggarwal A, Tan A, Tan P, Soo KC, Sabapathy K (2005) Evidence for Selective Expression of the p53 Codon 72 Polymorphs: Implications in Cancer Development. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **14** (9): 2245-2252
- Siddique M, Sabapathy K (2006) Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* **25** (25): 3489-3500
- Siepe D, Jensch S (2009) Prolyl isomerase Pin1 acts as a switch to control the degree of substrate ubiquitylation. *Nat Cell Biol* **11** (8): 967-972
- Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH (2000) p21 inhibits Thr 161 phosphorylation of cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* **275** (39): 30638-30643
- Soubeyrand S, Schild-Poulter C, Haché RJ (2004) Structured DNA promotes phosphorylation of p53 by DNA-dependent protein kinase at serine 9 and threonine 18. *Eur J Biochem.* **271** (18): 3776-3784
- Soussi T, May P (1996) Structural Aspects of the p53 protein in Relation to Gene Evolution: A Second Look. *J. Mol. Biol.* **260**: 623-637
- Stiewe T (2007) The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **7** (3):165–168

- Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, Hiller L, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T (2004) Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* **23** (19): 3328-3337
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404** (6773): 42-49
- Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**: 1803-1815
- Teodoro JG, Branton PE (1997) Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol.* **71** (5): 3620-3627
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999) Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. *Mol. Cell. Biol.* **19** (2): 1092-1100
- Toledo F, Lee CJ, Krummel KA, Rodewald LW, Liu CW, Wahl GM (2007) Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol Cell Biol.* **27** (4):1425-1432
- Tsai MH, Chen X, Chandramouli GV, Chen Y, Yan H, Zhao S, Keng P, Liber HL, Coleman CN, Mitchell JB, Chuang EY (2006) Transcriptional responses to ionizing radiation reveal that p53R2 protects against radiation-induced mutagenesis in human lymphoblastoid cells. *Oncogene* **25** (4): 622-632
- Tsvetkov P, Reuven N, Prives C, Shaul Y (2009) Susceptibility of p53 Unstructured N Terminus to 20S Proteasomal Degradation Programs the Stress Response. *J. Biol. Chem.* **284**: 26234-26242
- van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJ, Brandt BW, Slagboom PE, Westendorp RG (2005) Variation in the human p53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp.Gerontol.* **40** (1-2): 11-15
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J.* **17** (16): 4668-4679
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408** (6810): 307-310
- Vousden KH (2000) p53: death star. *Cell* **103** (5): 691-694
- Walker KK, Levine AJ (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (26):15335-15340
- Walter DH, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM, Dimmeler S (1998) Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from the mitochondria. *Circulation* **98** (12): 1153-1157
- Wang QE, Zhu Q, Wani G, Chen J, Wani AA (2004¹) UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damage-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* **25** (6): 1033-1043
- Wang J, Wiltshire T, Wang Y, Mikell C, Burks J, Cunningham C, Van Laar ES, Waters SJ, Reed E, Wang W (2004²) ATM-dependent CHK2 activation induced by anticancer agent, irifolven. *J.Biol.Chem.* **279** (38): 39584-39592
- Weinberg WC, Denning MF (2002) p21WAF1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13** (6): 453-464
- Weischer M, Röcken M, Berneburg M (2007) Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion? *Exp Dermatol.* **16** (5): 385-393

- Wong TS, Rajagopalan S, Townsley FM, Freund SM, Petrovich M, Loakes D, Fersht AR (2009) Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* **37**(2): 568-581
- Wright PE, Dyson HJ (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* **293** (2): 321-331
- Wulf GM, Liou YC, Ryo A, Lee SW, Lu KP (2002) Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **277** (50): 47976-47979
- Xu H, Tai J, Ye H, Kang CB, Yoon HS (2006) The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-XL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341** (4): 938-944
- Xu J, Morris GF (1999) p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* **19** (1): 12-20
- Yamabe Y, Shimamoto A, Goto M, Yokota J, Sugawara M, Furuichi Y (1998) Sp1-mediated transcription of the Werner helicase gene is modulated by p53 and Rb. *Mol. Cell. Biol.* **18** (11): 6191-6200
- Zhao Y, Chen Y, Schutkowski M, Fischer G, Ke H (1997) Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* **5** (1): 139-146
- Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, Gu L, Tang X, Lu KP, Xiao ZX (2002) The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* **419** (6909): 849-853
- Zhu J, Jaing J, Zhou W, Zhu K, Chen X (1999) Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene* **18** (12): 2149-2155
- Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N, Neagu MR, Nilsson M, Eriksson PS, Hagberg H, Luban J, Kroemer G, Blomgren K (2007) Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *The Journal of Experimental Medicine* **204** (8): 1741-1748
- Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL, Murphy M (2001) The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **21** (12): 3974-3985

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
mA	Milliampere
Abb.	Abbildung
A.d.	destilliertes Wasser
Ak	Antikörper
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
APO	Apoptose
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure/n
ASSP	apoptosis stimulating protein of p53
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia- and RAD3-related
ATRIP	ATR-interagierendes Protein
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
Bcl	B-cell lymphoma
BER	Basen-Exzisionsreparatur
β-ME	beta-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BTG	B-cell translocation gene
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca	zirka
c-Abl	cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
CAK	Cdk-aktivierende Kinase
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CH	Schweiz
CHAPS	3-(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
Chk	Checkpoint Kinase
CMF	Kalzium- und Magnesium-frei
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoIP	Co-Immunopräzipitation
CsA	Cyclosporin A
Cyp 18	Cyclophilin 18 (Cyclophilin A)
D	Deutschland
1DE	eindimensionale Elektrophorese
2DE	zweidimensionale Elektrophorese
kDa	Kilodalton

DABCO	1.4-Diaza-bicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DDB2	DNA damage-binding protein 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	Death (Todes)-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	fötales Kälberserum
FKBP	FK506-Bindeprotein
FW	Far Western
GADD	Growth Arrest and DNA Damage
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde/n
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-1	high mobility group protein 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hp53	humanes p53
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPV	humane Papillomviren
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschock-Protein
iASSP	inhibitory member of the ASPP family
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IgL, (L)	Antikörper – leichte Kette
IgS, (H)	Antikörper – schwere Kette

IkB	Inhibitor von kappa B
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IR	ionisierende Strahlung
J/m ²	Joule pro Quadratmeter
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Knockdown	Stilllegung eines Gens
LC	Liquid-Chromatografie
M	mol/L
Mdm2	murine double minute 2
MdmX	Mdm2-related protein
MEF	embryonale Mausfibroblasten
Mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute/n
MLH	MutL protein homolog
MM	Magermilch
MMR	Fehlpaarungsreparatur
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
MS	Massenspektrometrie
MSH	MutS protein homolog
mSin3a	Säugetier (mammalian) Sin3a
mut	mutiert/-e/-es
MWCO	molecular-weight cut off
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nucleotid-Excisionsreparatur
NFAT	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NF-κB	Nuklearer Faktor aktivierter B-Zellen
NHEJ	non-homologous end joining
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NL	die Niederlande
nLC-MS	Kopplung von nanoHPLC und MS
NLS	Kernlokalisierungssequenz
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
NOXA	latein. Schaden
NP-40	Nonidet P40
OGP	Octyl-glucosid-pyranosid
P	Prolin
p53 Δ pro	p53-Protein mit deletierter Prolin-reicher Region
p53AIP1	p53-reguliertes Apoptosis-induzierendes Protein 1
p53R2	TP53-induzierbare Ribonukleotid Reduktase 2
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PES	Polyethersulfon
PFA	para-Formaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
PI3	Phosphatidyl-Inositol 3
PIG	p53-induced gene
Pin1	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomerase NIMA-interacting 1
Pirh2	p53-induced RING-H2 protein
PK	Proteinkinase
PML	Promyelozytische Leukämie
PMS	postmeiotic segregation increased 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
Pro	Prolin
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma Protein
RECQ	ATP-dependent DNA helicase Q
rek.	rekombinant
Reprimo	steht für stop/repress
RH	Rehydratisierung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseA	Ribonuklease A
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
Sak	Staphylokinase
sek	Sekunden
SDS	Natrium-dodecylsulfat
T	Threonin
TBP	Tributylphosphin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung -Tween
TEMED	N.N.N'.N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLS	translesion sythesis
Topo	DNA Topoisomerase
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Trisma Base
UE	Untereinheit
USA	United States of America
UV	ultraviolet
V	Valin
Vh	Voltstunden
4-VP	4-Vinyl-pyridin
XPC	Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein
WB	Western Blot
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Protein-Domänen des p53	3
Abb. 1.2:	p53-abhängige Apoptose-Signalwege	5
Abb. 1.3:	p53-vermittelter Zellzyklusarrest	7
Tab. 1.4:	p53-abhängige Regulierung der Expression von DNA-Reparatur-Genen	9
Tab. 1.5:	Posttranslationale Modifikationen des p53 als Antwort auf verschiedene genotoxische und nicht-genotoxische Stressfaktoren	10
Abb. 1.6:	Regulierung des p53-Abbaus durch Mdm2	12
Abb. 1.7:	Aminosäuresequenz der Prolin-reichen Region des p53	13
Abb. 1.8:	<i>cis/trans</i> Isomerisierung von Peptidyl-prolyl Bindungen	16
Abb. 1.9:	Komplex aus humanem Cyclophilin 18 und Cyclosporin A	19
Abb. 1.10:	Strukturformel des Cyclosporin A	20
Abb. 3.1:	Nachweis von zytoplasmatischen und nuklearen Markerproteinen	44
Abb. 3.2:	Subzelluläre Lokalisierung des p53-Proteins in CEM- und MCF-7-Zellen	45
Abb. 3.3:	Schematischer Ablauf der Identifizierung von p53-interagierenden Proteinen	46
Abb. 3.4:	Proteomische Studien zur Identifizierung von p53-Interaktionspartnern mittels ESI-Massenspektrometrie	47/48
Abb. 3.5:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine p53 und Cyp 18 in verschiedenen Tumorzelllinien und embryonalen Mausfibroblasten	49/50
Abb. 3.6:	MS-Analyse posttranslationaler Modifikationen des Wt-p53	51
Abb. 3.7:	Detektierung von Cyclophilin 18 – Isoformen in der 2D-Gel-Analyse	52/53
Abb. 3.8:	MS-Analyse posttranslationaler Modifikationen des Cyp 18-Proteins	54
Abb. 3.9:	<i>In vitro</i> Analyse der p53/Cyp 18-Interaktion	55
Abb. 3.10:	Involvierung des aktiven Zentrums des Cyp 18-Enzyms in die p53-Interaktion	56
Abb. 3.11:	Analyse der Interaktion von p53 und Cyp 18 in verschiedenen Zelllinien	57
Abb. 3.12:	Cyp 18 interagiert mit der Prolin-reichen Region des p53-Proteins	58/59
Abb. 3.13:	Cyp 18 inhibiert die Sequenz-spezifische p53/DNA-Bindung <i>in vitro</i>	60
Abb. 3.14:	p53-abhängige Änderung der Verteilung der Zellzyklusphasen nach Cyclosporin A-Behandlung	61
Abb. 3.15:	p53-Aktivierung und p53-Zielgen-Expression nach Cyclosporin A- Behandlung und UVC-Bestrahlung	63
Abb. 4.1:	Aktivierung, Regulation und Funktionen des p53-Proteins	64
Abb. 4.2:	Molekulares Modell der p53/Cyp 18-Interaktion	71

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die in der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Biochemische und funktionelle Charakterisierung der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 und der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18“ im Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut e. V., unter Leitung von Prof. Dr. Frank Grosse, mit Unterstützung durch Dr. Bernhard Schlott, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Biologisch-Pharmazeutischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) zu Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Baum N, Schiene-Fischer C, Frost M, Schumann M, Sabapathy K, Ohlenschläger O, Grosse F, Schlott B (2009) The prolyl *cis/trans* isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis. *Oncogene*, **28** (44): 3915-3925

Baum N, Schlott B, Schiene-Fischer C, Ohlenschläger O, Sabapathy K, Grosse F (2009) The prolyl *cis/trans* isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis (Posterpräsentation), vorgestellt auf dem 2nd German-French DNA Repair Meeting, Konstanz (Posterpreis) und der 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, Essen

Baum N, Schlott B, Fischer G, Grosse F (2007) The PPIase Cyclophilin 18 binds to the proline-rich region of p53 and affects its DNA binding activity (Posterpräsentation), vorgestellt auf dem SFB 604-Meeting, Jena und dem First German-French DNA Repair Meeting, Toulouse (Frankreich)

Baum N, Schlott B, Grosse F (2005) "The complexity of p53-protein interaction estimated by MS" (Vortrag), Prot Net Meeting, Jena

Jena, den

Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle bei **Prof. Frank Grosse** und **Dr. Bernhard Schlott** für die Überlassung dieses überaus interessanten Forschungsthemas und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich danke Ihnen für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und Ihre Unterstützung in der Verwirklichung meiner eigenen Ideen.

Bei **Dr. Matthias Görlach** (FLI-Jena) und **Prof. Matthias Dürst** (FSU-Jena) möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie die Aufgabe, Mitglieder meines PhD-Komitees der Leibniz Graduate School on Ageing and Age-Related Diseases (LGSA) zu sein, übernommen haben und mir mit ihrer Erfahrung stets zur Seite standen.

Prof. Gunther Fischer und **Dr. Cordelia Schiene-Fischer** der Max Planck Research Unit for Enzymology of Protein Folding in Halle gilt mein herzlicher Dank für die überaus interessante und ertragreiche wissenschaftliche Kooperation.

Frau Anita Willitzer möchte ich für ihre freundliche und aufmerksame Unterstützung im Labor und für die vielen gemeinsamen lustigen Stunden danken. **Annerose Schneider** und **Dr. Oliver Ohlenschläger** danke ich nicht nur für ihre offenen Ohren und ihre Hilfsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle **Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biochemie** am FLI-Jena für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die lustigen gemeinsamen „Wandertage“. Auch danke ich **Anja, Sibyll, Kristin, Josi, Rese, Christian, Katja, Yvonne, Michela, Sabine, Thomas** und **Katrin** für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Meinen Eltern, **Marina und Wolfgang Baum**, möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Nicht zuletzt gilt **Michael, Nils** und **Paul** mein besonderer Dank.

Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

